

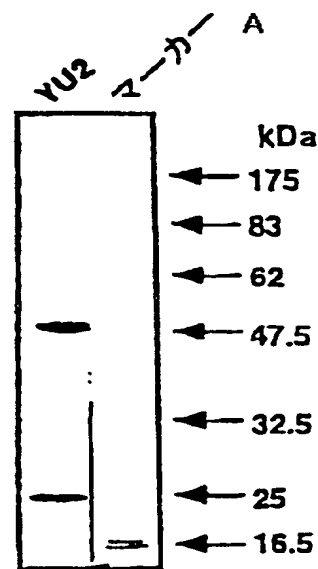
<p>(51) 国際特許分類6 C07K 16/18, C12N 5/20, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577, C12N 15/06</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/02922</p> <p>(43) 国際公開日 2000年1月20日(20.01.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03656</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月6日(06.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平PCT/JP98/03120 1998年7月10日(10.07.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 山元 弘(YAMAMOTO, Hiroshi)[JP/JP] 〒560-0054 大阪府豊中市桜の町7丁目11-1-103 Osaka, (JP) 辻川和丈(TSUJIKAWA, Kazutake)[JP/JP] 〒666-0145 兵庫県川西市けやき坂3丁目11-7 Hyogo, (JP) 内野由紀子(UCHINO, Yukiko)[JP/JP] 〒533-0004 大阪府大阪市東淀川区小松1丁目15-20-213 Osaka, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 角田嘉宏, 外(SUMIDA, Yoshihiro et al.) 〒650-0031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所 Hyogo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54)Title: ANTIBODY AGAINST PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE INTRACELLULAR DOMAINS

(54)発明の名称 プロテインチロシンホスファターゼの細胞内ドメインに対する抗体

(57) Abstract

An antibody specific to intracellular domains of at least two protein tyrosine phosphatases; a process for preparing the same; and cells producing the above antibody. This antibody, which has specificities to intracellular domains of both of phosphatase subunits LAR and CD45, is useful in analyzing and quantitating PTPs, identifying and detecting a novel PTP, acquiring a novel phosphatase by cloning, etc., as well as developing a diagnostic method useful in insulin resistance and NIDDM, preventing, treating (curing, etc.) and diagnosing various symptoms of syndrome X based on insulin resistance, and preventing and diagnosing the onset of arteriosclerosis and heart diseases.



A...MARKER

2種以上のプロテインチロシンホスファターゼの細胞内ドメインに対する特異性を有する抗体、その調製方法およびかかる抗体を生産する細胞を開示する。本発明の抗体は、LARおよびCD45の双方のホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有し、PTPの解析および定量、新規PTPの同定および検出、ならびにクローニング等による新規ホスファターゼの取得の他、インスリン抵抗性およびNIDDMに有用な診断方法の開発、インスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防、治療等の処置および診断、そして動脈硬化および心疾患発症の予防および診断に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IN	インド	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

プロテインチロシンホスファターゼの
細胞内ドメインに対する抗体

5

〔技術分野〕

本発明は、2種以上のプロテインチロシンホスファターゼ (Protein Tyrosine Phosphatase、以下、PTPと称する) の中の細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体およびその調製方法に関する。さらに詳細には、

1 0 PTP (例えば、LAR (白血球共通抗原類似分子) およびCD45) における細胞内ドメインに対して特異的であって、PTPの解析および定量、新規PTPの同定、検出および単離精製、ならびにインスリン抵抗性に関わる症状の治療、予防、緩和等のための処置や診断に適用可能な医薬の開発などに有用な抗体に関する。

1 5

〔背景技術〕

近年、動脈硬化発症メカニズムが徐々に明らかにされ、その危険因子が同定されつつある。特に高コレステロール血症、高血圧症、糖尿病および喫煙が動脈硬化の4大危険因子と認定され、その治療が積極的に行

2 0 われている。これらの病態として臨床的に共通しているのが、インスリン抵抗性である。インスリン抵抗性とは細胞におけるインスリン感受性の低下とほぼ同義語であり、細胞での糖の取り込みにおけるインスリン作用が低下していることを指す。その原因としてはインスリン分泌自体の異常、標的細胞におけるインスリン受容体の異常、細胞内情報伝達系

2 5 の異常および血行力学的に末梢循環障害に基づく糖の組織への供給減等がある。Reavenは1988年、このインスリン抵抗性を基盤として多くの病

態が引き起こされることを報告し、また、インスリン抵抗性、耐糖能異常、高インスリン血症、高トリグリセライド血症、低 HDL コレステロール血症、高血圧をマルチプルに持つ病態をシンドローム X と名付け、動脈硬化発症に深く関わっていることを提唱した (Reaven, G. M. *et al.*

5 ; *Diabetes*, 37, 1595-1607, 1988)。

また、一般的に、インスリン抵抗性により細胞への糖の供給は低下し、膵臓におけるインスリン分泌を亢進させ、高インスリン血症を引き起こすことが知られており、臨床の場合においてもインスリン抵抗性の問題が種々浮上している。例えば、インスリン抵抗性・高インスリン血症が糖

1 0 尿病性腎症を促進し (Niskanen, L. *et al.* ; *Diabetes*, 41, 736-741, 1993)、糖尿病性網膜症の頻度が高くなる (Yip, J. *et al.* ; *Lancet*, 341, 369-370, 1993) という報告がある。さらに、インスリン抵抗性によってプラスミノゲン活性化因子阻害剤 1 (PAI-1) の活性が上昇し、血液線溶系機能を低下させたり (Potter van Loon BJ *et al.* ; *Metab.*
1 5 *Clin. Exp.*, 42, 945-954, 1993)、粥状動脈硬化の引き金になる (Sato, Y. *et al.* ; *Diabetes*, 38, 91-96, 1989) という文献等も報告されている。

糖尿病は有病率が全人口の 5% を占め、日本人の約 600 万人が罹患している。糖尿病にはインスリン依存性糖尿病 (IDDM) とインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) がある。IDDM は糖尿病全体に対して約 7%、NIDDM は約 90% といわれ、特に、糖尿病の大多数を占める NIDDM の発症は、イン
2 0 スリン抵抗性が重要な成因と考えられている。

現在までに、インスリンのシグナル伝達には細胞内蛋白質のチロシンリン酸化が重要な役割を演じていることが明らかとされている。インス
2 5 リンレセプターは分子量約 135 kDa の α サブユニットと 95 kDa の β サブユニットの 2 つの糖タンパクサブユニットがジスルフィド結合によりへ

- テロテトラマーを形成し、 $\alpha 2 \beta 2$ 構造をとる。 α サブユニットはインスリン結合活性を有し、 β サブユニットは自己リン酸化により活性化するプロテインチロシンキナーゼ (Protein Tyrosine Kinase : PTK) ドメインを有する。すなわち、インスリンがインスリンレセプター-の α 鎖に結合すると、インスリンレセプター β 鎖に存在するいくつかの特定のチロシン残基がレセプターのチロシンキナーゼ活性により自己リン酸化される。インスリンレセプターチロシンキナーゼは自己チロシンリン酸化によってそのチロシンキナーゼ活性がさらに上昇する。このようにして活性化されたインスリンレセプターチロシンキナーゼは、細胞内に存在するその基質である IRS (insulin receptor substrate) をチロシンリン酸化し、このチロシンリン酸化 IRS-1を Ash/Grb2やPI-3 キナーゼが認識して結合することによりシグナルが伝達され、最終的にグルコースの取り込み、糖代謝や細胞増殖といったインスリンによる生物活性が発現することが明らかとされている (第9図参照、Goldstein, B. J. *et al.* ; *Receptor*, 3, 1-15, 1993, Kanai, F. *et al.* ; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195(2), 762-768, 1993)。しかし、このインスリンのシグナル伝達において、活性化されたインスリンレセプターを不活化する酵素、すなわちチロシン脱リン酸化酵素である PTPの研究はほとんど進展していない。
- また、やはりチロシンリン酸化により巧みに制御されている、リンパ球の活性化、増殖、分化、細胞死など免疫系の基礎となる機構もその例外でない。これまでPTKからみたリンパ球のシグナル伝達の研究が主流であったが、最近PTPからの解析も進み、両面から検討することの重要性が明らかとなってきた。
- PTPに関する研究が本格的に始まったのは、1988年にFischerのグループによりヒト胎盤由来細胞質型のPTPであるPTP1Bの遺伝子がクローニン

- グされ、そのヌクレオチド配列が解明されてからである (Tonks, N. K. *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 263, 6722-6730, 1988, Charbonneau, H. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-7186, 1988)。その結果、PTP1Bと相同性を示したのは既知のセリン／スレオニンホスファターゼではなく、造血系の膜貫通分子であるCD45の細胞質内領域の2カ所であった。さらに、CD45がPTP活性を有していることも明らかにされた (Tonks, N. K. *et al.* ; *Biochemistry*, 27, 8695-8701, 1988, Charbonneau, H. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7182-7186, 1988)。
- 10 ヒトではPTP遺伝子は500個に及ぶと推定されており、現在までに80種以上のPTPがcDNA配列の相同性に基づいてクローニングされ、今なお次々と新しいPTPが報告されている (Streuli, M. *et al.* ; *J. Exp. Med.*, 168, 1523-1530, 1988, Krueger, N. X. *et al.* ; *EMBO J.*, 9, 3241-3252, 1990, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Biochim Biophys. Acta*, 1095, 46-56, 1991)。このように、スーパーファミリーを形成しているPTPは大きく3つのファミリーに分類される。すなわち、PTP、DS-PTP (dual-specificity-PTP : 二重特異性PTP) およびLMW-PTP (low molecular weight-PTP : 低分子量PTP) の3群である。それぞれのファミリー間の1次構造の相同性はそれほど高くなく、特にPTPとLMW-PTPとは
- 15 酵素活性中心以外は相同性は示さないが、クリスタログラフィーによる研究より、これらのファミリーに属する分子の3次構造は驚くほどの共通性を示すことが明らかにされた (Fauman, E. B. *et al.* ; *Trends Biochem. Sci.*, 21, 413-417, 1996)。更に、PTPは、(1)細胞膜貫通部分を持つ受容体型 (あるいは膜型) PTP (LCA (白血球共通抗原 (Leukocyte Common Antigen)) すなわちCD45、LARならびにPTP α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 σ 、 μ 、 κ 、 η 、 ζ 等) と、(2)細胞膜貫通部分を持たない細胞質型
- 20
- 25

PTP (PTP1B、TC-PTP、PTP-MEG、PTPH1、STEP、PTP1C、FAP1、SHP1、SHP2、PEP、PTP-PEST等)とに大別される。

受容体型PTPの多くは、細胞内に2つのPTP相同部分（ドメイン 1およびドメイン 2、第1図(a)および(b)参照）を持っている。現在までに報告
5 されている全てのPTPには、Ile/Val-His-Cys-Xaa-Ala-Gly-Xaa-Xaa-Arg-Ser/Thr-Gly（配列番号：2）というシステインを含む配列（signature motif）がホスファターゼドメイン内に保存されている。PTP1Bのクリスタログラフィーによる研究から、この部位はPTP分子表面の小さな窪みを形成しており、システインは窪みの底に位置しリン酸との結合に直接
10 関与していることが明らかにされた（Barford, D. *et al.* ; *Science*, 263, 1397-1404, 1994）。また、PTP1Bの酵素活性の中心の窪みにはセリンやスレオニンに結合しているリン酸は到達できないことから、窪みの深さがPTPとセリン／スレオニンホスファターゼの特異性を決定していることも示された。さらに、前記signature motifの酵素活性発現における
15 重要性は、変異実験から明らかにされている（Streuli, M. *et al.* ; *EMBO J.*, 9, 2399-2407, 1990）。これらのことから、ドメイン 1の保存されたCysが酵素活性発現に重要であり、またドメイン2は酵素の基質特異性を決めていると考えられている。

受容体型PTPは細胞内に2個または1個の酵素領域をもち、細胞外ド
20 メインの特徴により、いくつかのグループに分けられる。細胞外にフィブロネクチンタイプIII型ドメインを1個有し、高度に糖鎖修飾されたCD45、Ig様ドメインとフィブロネクチンタイプIII型ドメインを有するLAR、PTP δ 、PTP σ 、N末端にMAM(meprin、A5抗原、PTP μ)ドメインを有するPTP μ 、PTP κ 、N末端に炭酸脱水酵素ドメインを有するPTP γ 、PTP ξ 、細胞外ド
25 メインの短いPTP α 、PTP ϵ があり、以上のPTPはいずれも2個の酵素領域を持つ。一方、酵素領域が1個のものはいずれも細胞外ドメインがフィ

ブロネクチンタイプIII型ドメインのみで構成され、PTP β 、CD148(PTP η 、DEP-1等)がある。

細胞質型PTPは原則として酵素領域を1個有し、非酵素領域の特徴によりいくつかのグループに分けられている。SH2領域、PEST領域、band4.

- 5 1領域を有するものがある。DS-PTPはチロシンのみならず、セリンあるいはスレオニン残基を脱リン酸化する酵素で、Cdc25、MAPキナーゼホスファターゼ、VH-1等がある。LMW-PTPは酵素領域のみから構成されており、分子量は約18 kDaと報告されている。

- PTP酵素群のうち、ヒト由来のLARは、受容体型PTPであるCD45のホスファターゼドメインをプローブとしてヒト胎盤ゲノムライブラリーによりクローニングされた、受容体型PTPである (Streuli M. *et al.* ; *J. Exp. Med.*, 168, 1553-1562, 1988)。CD45が血球系の細胞に特異的に発現しているのに対して、LARは血球系以外の細胞、特に肝臓や骨格筋などのインスリン感受性組織に発現している (Goldstein B. J. ; *Receptor*, 10 3, 1-15, 1993)。多くの受容体型PTPの中でLARはその細胞外ドメインが細胞接着分子と類似しているため、特に興味深い。その全構造は、Ig様ドメインとフィブロネクチンIII型ドメインよりなる 150 kDaの細胞外ドメイン E-サブユニットと、膜貫通領域を持ち 2つのホスファターゼドメインよりなる 85 kDaの細胞内ドメインである P-サブユニット (ホスファターゼサブユニット、配列番号: 1 に示される) が細胞膜のすぐ外側で非共有結合していることが明らかとなっている (第1図参照)

- (Streuli M. *et al.* ; *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992)。また、LARはPTP δ やPTP σ とともにサブファミリーを構成し、接着斑 (インテグリンによる細胞外基質との接合部の周辺部分やadherens junction(カドヘリンによる細胞同士の接着部位)に存在する (Serra-Pages, C. *et al.* ; *EMBO J.*, 14, 2827-2838, 1995, Pulido, R. *et al.* ; *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 92, 11686-11690, 1995, Kypta, R. M. *et al.* ; *J. Cell Biol.*, 134, 1519-1530, 1996, Aicher, B. *et al.* ; *J. Cell Biol.*, 138, 681-696, 1997)。

- 現在までにLARの機能的な役割が数多く報告されている。例えば、LAR
- 5 が欠損した神経細胞ではニューロトロフィンへの反応性が減少すること (Yang, T. *et al.* ; 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, Louisiana, USA, October 25-30, 1997, *Society for Neuroscience Abstracts*, 23, 1-2, 1997)、ショウジョウバエのLAR ホモログは、主に神経系で発現し、その欠損は運動神経の軸
- 10 索が神経束から分離するタイミングを遅らせること (Krueger, N. X. *et al.* ; *Cell*, 84, 611-622, 1996)、LAR酵素ドメインの遺伝子破壊では乳腺発育の不良が認められること (Schaapveld, R. Q. *et al.* ; *Dev. Biol.*, 188, 134-146, 1997)、LAR活性の抑制によりアポリポプロテイン Bの分泌が減少すること (Phung, T. L. *et al.* ; *Biochemical and*
- 15 *Biophysical Research Communications*, 237(2), 367-371, 1997)、また、LARの発現が欠損することにより前脳基底部のコリン作動性神経細胞のサイズが小さくなり、海馬歯状回でのコリン作動性神経支配が減少する (Yeo, T. T. *et al.* ; *J. Neurosci. Res.*, 47(3), 348-360, 1997)ことが報告されている。このように、LARは生体内で様々な役割を担っていることが徐々に明らかになってきているが、現在最も注目が集められて
- 20 いる研究として、LARとインスリン受容体との関係がある (Ihashimoto, N. *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 267(20), 13811-13814, 1992)。

- 1995年、肥満者の脂肪組織において LARのチロシンホスファターゼ活性が異常に上昇しており、これがインスリン抵抗性の発症原因として、
- 25 また、心臓血管疾患の危険因子として考えられ、注目されるべきであるとの発表が行われた (Ahmad, F. *et al.* ; *J. Clin. Invest.*, 95(6),

2806-2812, 1995)。以後、LARがインスリン受容体と密接に関与しているという報告が次々になされている (Mooney, R. A. *et al.* ; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(3), 709-712, 1997, Orr, S. R. *et al.* ; *Biochemical Society Transactions*, 25(3), 452S, 1997, Ahmad, F. *et al.* ; *J. Clin. Investigation*, 100(2), 449-458, 1997, Ahmad, F. *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 272(1), 448-457, 1997, Norris, K. *et al.* ; *Febs Letters*, 415(3), 243-248, 1997, Li, P. M. *et al.* ; *Cellular Signalling*, 8(7), 467-473, 1996)。そして、これらの情報に基づき、最近Ahmad, F. らのグループはLARおよびPTP1Bがインスリン抵抗性の治療ターゲットとなり得るかもしれないと報告している (Ahmad, F. *et al.* ; *Metabolism, Clinical and Experimental*, 46(10), 1140-1145, 1997)。

次に、PTPのうちCD45は、白血球共通抗原 (LCA)とも呼ばれ、成熟赤血球や血小板を除くすべての血液細胞 (白血球) およびその前駆細胞において発現される細胞表面抗原である。CD45は分子量180~220KDaの受容体型PTPであり、細胞内に 2つの酵素領域を持ち、細胞外領域のN末端に近い3~4個のエクソンのオルターナティブスプライシングにより、8~9種類のアイソフォームが存在する (Saga, Y. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5364-5368, 1987, Thomas, M. L. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5360-5363, 1987, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 85-116, 1994)。スプライシングを受けるこれらのエクソンでコードされるアミノ酸配列は、セリン、スレオニンおよびプロリンに富み、 α -ヘリックスや β 構造によるまとまった立体構造はとりにくく、また、O-グリコシレーションを受ける部位を多数含んでいる (Barclay, A. N. *et al.* ; *EMBO J.*, 6, 1259-1267, 1987)。従って、アイソフォームの変化により、細胞外領域の構造が大きく変わ

り得るという特徴をもっている。また、CD45の発現はリンパ球で高く、細胞種や細胞の活性化状態によって固有のアイソマーが可逆的に発現される (Thomas, M. L. *et al.* ; *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 339-369, 1989, Charbonneau, H. *et al.* ; *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 8, 402-493, 1992, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 85-116, 1994)。また、オルターナティブな構造と膜貫通部位に挟まれた領域の配列はシステインを多く含み、ジスルフィド結合によって安定化された構造を形成している (Thomas, M. L. *et al.* ; *Cell*, 41, 83-93, 1985, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 266, 23517-23520, 1991, Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Biochim. Biophys. Acta*, 1095, 46-56, 1991)。

CD45の発現が消失したT細胞変異株では、その細胞が本来有していた抗原特異的応答能が顕著に低下することが知られており、T細胞レセプター (TCR) を介したT細胞の活性化と機能発現にCD45が極めて重要であることが示唆されている (Charbonneau, H. *et al.* ; *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 339-369, 1989, Pingel, J. T. *et al.* ; *Cell*, 58, 1055-1065, 1989, Trowbridge, I. *et al.* ; *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 85-116, 1994, Koretzky, G. A. *et al.* ; *Nature*, 346, 66-68, 1990, Koretzky, G. A. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2037-2041, 1991, Weaver, C. T. *et al.* ; *Mol. Cell Biol.*, 11, 4415-4422, 1991)。また、TCR/CD3複合体を介したT細胞のシグナル伝達機構において、CD45はコ・レセプターであるCD4、CD8の細胞内ドメインに結合しているSrcファミリーのチロシンキナーゼ (PTK) であるLck (p56^{lck}) やFyn (p56^{fyn}) の活性化に関与していることも示唆されている (Trowbridge, I. S. *et al.* ; *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 85-116, 1994, Penninger, J. M. *et al.* ; *Immunol. Rev.*, 135, 183-214,

- 1993)。CD45はLckやFynのC末端に位置する負の調節部位のチロシン残基を脱リン酸化し、その結果、LckやFynが自己リン酸化して活性型となり、シグナルが伝達され则认为られている (Penninger, J. M. *et al.* ; *Immuno. Rev.*, 135, 183-214, 1993, Ledbetter, J. A. *et al.* ;
- 5 *Curr. Opin. Immunol.*, 5, 334-340, 1993, Janeway, C. A. Jr. ; *Annu. Rev. Immunol.*, 10, 645-674, 1992, Cahir, McFarland, E. D. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1402-1406, 1993, Hurley, T. R. *et al.* ; *Mol. Cell Biol.*, 13, 1651-1656, 1993, Sieh, M. *et al.* ; *EMBO J.*, 12, 315-321, 1993, Weiss, A. *et al.* ; *Cell*, 76,
- 10 263-274, 1994, Chan, A. C. *et al.* ; *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 555-592, 1994)。インスリン反応性ミエローマ細胞のうち、CD45欠損株を用いた実験により、CD45発現株と比較して、インスリン刺激によるインスリン受容体の自己リン酸化、IRS-1のチロシンリン酸化、PI3キナーゼの活性化およびMAPキナーゼの活性化がすべて3倍に増強したという報告
- 15 告 (Kulas, D. T. *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 271, 755-760, 1996) より、CD45はLARと同様インスリンの負の調節因子であると考えられる。さらに、CD45欠損細胞の反応性は、CD45の細胞内領域だけをもつ分子の発現により回復することが次の実験から明らかにされている。すなわち、CD45の細胞内領域だけを細菌、またはバキュロウィルスの系で発現さ
- 20 せてもチロシンホスファターゼの酵素活性が十分に観察されること (Ostergaard, H. L. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8959-8963, 1989, Streuli, M. *et al.* ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8698-8702, 1989)、また、CD45陰性T細胞クローンにCD45の細胞内領域をトランスフェクトするだけで抗原レセプターを介するシグナ
- 25 ルが回復すること (Volarevic, S. *et al.* ; *Science*, 260, 541-544, 1993, Hovis, R. R. *et al.* ; *Science*, 260, 544-546, 1993, Desai,

D. M. *et al.* ; *Cell*, 73, 541-554, 1993) などである。

一方、B細胞においても、初期シグナルの伝達のみならず、最終的な増殖、またはアポトーシスに至る過程も、CD45の発現によって調節されていることが、CD45を発現していない形質細胞種 (Justement, L. B. *et al.* ; *Science*, 252, 1839-1842, 1991)、または未熟B細胞株から樹立したCD45陰性クローンを用いた実験 (Ogimoto, M. *et al.* ; *Int. Immunol.*, 6, 647-654, 1994) から示された。これらの結果は、CD45が抗原レセプターを介するシグナル伝達に不可欠な役割を担っている分子であることを示唆している。

- 1 0 現在までのLARおよびCD45等のPTPに関する研究より、細胞内情報伝達系においてPTPがPTKと共役して極めて重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。

- 1 5 1992年にStreuliらのグループによって、LARのE-サブユニットとP-サブユニットの結合が非共有結合のため解離し、E-サブユニットが細胞膜表面から外れることが明らかにされた (Streuli, M. *et al.* ; *EMBO J.*, 11, 3, 897-907, 1992)。しかしながら、多くの研究者は、LARの細胞外ドメインであるE-サブユニットに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を使用して様々な研究を行ってきたため、単独でもホスファターゼ活性を有するP-サブユニットは全く無視されていた。例えば、LARのホスファターゼ活性測定を意図したLAR抗体の使用において、P-サブユニットに対する抗体を用いなければ全体としてのホスファターゼ活性が測定できない。また、LARファミリーの細胞外ドメインには mRNAのスプライシングの違いでいくつかのアイソフォームが存在しており (Krueger, N. X. *et al.* ; *Cell*, 84, 611-622, 1996、Mizuno, K. *et al.* ; *Mol. Cell Biol.*, 13, 5513-5523, 1993、Ogata, M. *et al.* ; *J. Immunol.*, 153, 4478-4487, 1994)、細胞外ドメインに対する抗体

を用いると、各々のアイソフォームに対し、特異性が異なってしまう。
本発明者らは、これらの状況に鑑み、PTPの細胞内ドメインに対する抗体
の作製に着手した。

- また、従来CD45抗体については、T200またはB220などの異なる分子量
5 を有するCD45アイソフォームのいずれにも反応性を示す抗体と、特定の
限定されたアイソフォームにのみ反応性を示す抗体を区別し、後者を
CD45R (restricted) 抗体として記述することが行われてきた (McMichael,
A. J. ; In *Leucocyte Typing III*. Oxford University Press, Oxford,
1987)。しかし、CD45の細胞外ドメインの構造の多様性が明らかにされ
1 0 るに伴い、CD45R抗体の特異性を分類する必要が生じている。Streuliら
はcDNAのトランスフェクタントを用いる方法によって、既に知られてい
るヒトCD45抗体の分類を行い、オルターナティブエキソン4、5、6に依存
する構造を認識する抗体をそれぞれCD45RA、CD45RB、CD45RCと記述する
ことを提唱した (Streuli, M. *et al.* ; *J. Immunol.*, 141, 3910-3914,
1 5 1988)。同様の方法でJohnsonらもマウスのCD45抗体の分類を報告した
(Johnson, P. *et al.* ; *J. Exp. Med.*, 169, 1179-1184, 1989)。

- なお、既知のPTPに対する抗体としては、CD45の膜貫通 (TM) 領域から
ホスファターゼドメイン1の一部に至る196アミノ酸残基のペプチドを抗
原として調製された抗体 (Transduction Laboratories社製) およびPTP
2 0 α のホスファターゼドメイン1 (260アミノ酸残基) に対する抗体
(Transduction Laboratories社製) が知られている。しかしながら、こ
れらの抗体がLARや、その他PTPのホスファターゼドメインに対して如何
なる免疫特異性を有するか否かは不明である。

2 5 [発明の開示]

本発明は、2種以上のPTPの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗

体、特に少なくとも1種以上の受容体型PTPの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を提供することを目的とする。特に、本発明の抗体は、LARおよび/またはCD45、好ましくはLAR及びCD45の双方の細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体を提供するものである。かかる抗体は、

5 特にPTPのホスファターゼドメインに対して特異性を有するものが好ましい。

前記抗体は、配列番号：1で示される塩基配列によってコードされる、LARのP-サブユニットに相当するポリペプチドまたはその断片を抗原として調製されるものが好ましく、また免疫特異性の点からモノクローナル

10 抗体であるとよい。

そして、係る抗体は、プロテインチロシンホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチドとを含む融合タンパク質を免疫原として用いることによって調製することができる。係る融合タンパク質を構成するプロテインチロシンホスファターゼドメインとしてはLARホスファターゼドメインが好ましく、その他のタンパク質またはポリペプチドとして、特にGST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）が好適であるが、他にも、ポリヒスチジン（好ましくは6個のヒスチジン）、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、プロテインA等を用いてもよい。

15

尚、ポリヒスチジンをを用いた場合、遺伝子組換え法にて発現させた融合タンパク質を単離精製するためには、ニッケルキレート樹脂への吸着を利用することができ、pH変動の他、EDTAまたはイミダゾール物質を添加することによって当該樹脂から解離することができる。CBPを用いた場合、発現させた融合タンパク質はカルモジュリンアフィニティー樹脂を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後EGTAを加えることにより当該樹脂から解離することができる。また、プロテインAを用いた場合、発現させた融合タンパク質はIgGセファロース（例え

20

25

ば、IgGセファロース6FF) カラムを使用したアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後pH変動によって当該樹脂から解離することができる。

さらに前記融合タンパク質を構成するタンパク質またはポリペプチド

- 5 断片の別の例として、Xpress、Thioredoxin、c-myc、V5およびHA/c-myc等を挙げることができ、これらをエピトープとして認識することができる抗体を用いて、目的とするLARホスファターゼドメインとの融合タンパク質を発現した後に抗原-抗体アフィニティークラムにより単離・精製することができる。

- 10 前記した、好ましい免疫原であるGSTとLARホスファターゼドメインを含む融合タンパク質は、GSTをコードする遺伝子領域およびLARのホスファターゼドメインをコードする遺伝子領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を、20~30℃にて16~24時間、特に好ましくは、23~25℃にて18時間培養し、その培養
- 15 液および/または菌体から融合タンパク質を単離することによって好適に製造することができる。さらにこうして得られた融合タンパク質は、グルタチオンを有する担体、例えば、グルタチオンセファロースビーズへのアフィニティーによって精製されたものであるとよく、当該グルタチオンセファロースビーズからの融合タンパク質の溶出は、界面活性剤
- 20 の存在下に煮沸することによって実施すればよい。この界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム、CHAPS (硫酸-3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン)、デオキシコール酸、ジギトニン、n-ドデシルマルトシド (1-O-n-ドデシル-β-D-グルコピラノシド)、n-ドデシルマルトシド (1-O-n-ドデシル-β-D-グルコピラノシド)、ノニデット (商品名) P40 (エチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル)n)、n-オクチルグルコシド (1-O-n-オクチル-β-D-グルコピラノシド)、モノラウリル酸シュク
- 25

- ローズ、テシット（商品名、ドデシルポリ（エリレングリコールエーテル） n ）、トリトン（商品名）X-100（オクチルフェノールポリ（エチレングリコールエーテル） n ）、ツィーン（商品名）20（ポリ（オキシエチレン） n -ソルビタン-モノラウレートレート）、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート〔以上、いずれも n は1以上の整数を表す〕等が挙げられる。融合タンパク質を溶出させる場合に、これらの界面活性剤を動物に投与しても問題にならない濃度、好ましくは、0.1%のドデシル硫酸ナトリウムの存在下、100℃にて5～10分間煮沸する。こうして、目的の免疫原として好ましい精製された融合タンパク質を得ることができる。
- 10

- このような融合タンパク質を免疫原として用いてモノクローナル抗体を取得する場合、抗体のスクリーニングにはプロテインチロシンホスファターゼドメイン、好ましくはLARホスファターゼドメインを用いてもよいが、免疫原として用いた融合タンパク質でスクリーニングを実施することが選択性の点で好ましい。
- 15

- 本発明のモノクローナル抗体として、マウス/マウスのハイブリドーマにより産生される、LARおよびCD45のホスファターゼサブユニットの細胞内ドメインに対して特異性を有するモノクローナル抗体が挙げられる。この抗体として、例えば、SDS-PAGE上の見かけの分子量が約146 kDaであるモノクローナル抗体がある。かかる抗体は、インスリンのシグナル伝達機構のさらなる解明のためのツールとして、またインスリン抵抗性およびNIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防、治療、診断等に応用できる。
- 20

- 本発明によってさらに、前記モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系が提供される。このハイブリドーマ細胞系として、本発明者によって1998年5月7日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3
- 25

号に所在の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された、受託番号がFERM BP-6344であるマウス/マウスハイブリドーマ細胞系YU2が挙げられる。

5 本発明の抗体は、天然産物由来または全体もしくは部分合成（化学合成、遺伝子組換えによる合成等）された、PTPタンパク質ならびに少なくともPTPの細胞内ドメインの一部（3アミノ酸残基以上、好ましくは5アミノ酸残基以上）を含む断片およびポリペプチド（以下、この断片およびポリペプチドを総称して「PTP由来分子」と称する）に対して特異的な免疫反応性を有する。

10 さらに本発明は、2種以上のプロテインチロシンホスファターゼサブユニットに対して特異性を有する抗体の調製方法であって、免疫原として前記したようなプロテインチロシンホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチド断片とを含む融合タンパク質、好ましくはGST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質を用いることを特徴とする方法を提供するものである。ここで、GST以外に使用可能な、融合タンパク質を構成するタンパク質またはポリペプチド断片、その融合タンパク質の精製方法は、前記したとおりである。

15 また、好ましい免疫原であるGSTとLARホスファターゼドメインとを含む融合タンパク質は、GSTをコードする遺伝子領域およびLARのホスファターゼドメインをコードする遺伝子領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を、20～30℃にて16～24時間、特に好ましくは、23～25℃にて18時間培養し、その培養液および/または菌体から融合タンパク質を単離することによって好適に製造することができる。さらにこうして得られた融合タンパク質は、グルタチオンを有する担体、例えば、グルタチオンセファロースビーズへの
20 アフィニティーによって精製されたものであるとよく、当該グルタチオ

ンセファロースビーズからの融合タンパク質の溶出は、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施すればよいことも前述のとおりであり、融合タンパク質を溶出させる場合に、これらの界面活性剤を動物に投与しても問題にならない濃度、好ましくは、0.1%のドデシル硫酸ナトリウムの存在下、100℃にて5～10分間煮沸する。こうして、目的の免疫原として好ましい精製された融合タンパク質を得ることができる。

このような融合タンパク質を免疫原として用いてモノクローナル抗体を調製する方法において、抗体のスクリーニングには、プロテインチロシンホスファターゼドメイン、好ましくはLARホスファターゼドメインを用いてもよいが、免疫原として用いた融合タンパク質でスクリーニングを実施することが選択性の点で好ましい。

また、本発明によって、新規PTPを単離するための方法であって、PTPをスクリーニングする工程を含み、当該スクリーニング工程において如上の抗体が使用されることを特徴とする方法が提供される。前記スクリーニングとして、cDNAライブラリーの発現スクリーニングが企図される。

本発明の別の特徴において、PTPおよび/またはPTP由来分子の定量方法が提供される。この方法では、如上の抗体を使用して、被検試料中に含まれるPTPのタンパク質、および/または少なくともPTPの細胞内ドメインの一部を含む断片もしくはポリペプチドの量が測定される。この方法において、前記抗体が、イムノブロッティング、免疫沈降またはELISAのいずれかにおいて使用されることが好ましい。

本発明のさらなる特徴において、如上の抗体を用いて被検試料中に含まれるPTPのタンパク質、および/または少なくともPTPの細胞内ドメインの一部を含む断片もしくはポリペプチドを単離し、単離されたタンパク質、断片またはポリペプチドの活性を測定する工程を含むPTPおよび/またはPTP由来分子の活性を定量するための方法が提供される。この単離

工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が好適に用いられる。

さらに本発明は、PTPおよび／またはPTP由来分子を生産するための方法であって、如上の抗体を用いてPTPのタンパク質、および／または少なくともPTPの細胞内ドメインの一部を含む断片もしくはポリペプチドを単離する工程を含む方法を提供する。この単離工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が好適に用いられる。

また、本発明でさらに企図されるのは、PTPおよび／またはPTP由来分子の組織内における存在を確認するための方法であり、この方法において、如上の抗体を用いて免疫組織学的検査が行われる。免疫組織学的検査には、例えば、標識抗体を用いた *in situ* 免疫組織染色などの技術が採用され、PTPのタンパク質、および／または少なくともPTPの細胞内ドメインの一部を含む断片もしくはポリペプチドの検出を行う。

尚、本発明者らは、LARに対して特異的な免疫反応性を有するモノクローナル抗体が、甲状腺癌細胞を特異的に認識することを確認している。従って、本発明の上記抗体は、甲状腺癌の診断、治療等に有用であると考えられる。

〔図面の簡単な説明〕

第1図は、LARのサブユニット構造を示す模式図(a)、および実験例にて調製したLARの膜内ホスファターゼドメイン構造の変異体を示す模式図(b)である。

第2図は、LAR C/Sとインスリンレセプター (IR) の野生型とをコトランスフェクトしたCOS細胞において、インスリン刺激により誘導されるチロシンリン酸化の時間経過を示すイムノプロットを表す図である。

第3図は、LARの野生型または変異体とインスリンレセプターの野生型

とをコトランスフェクトしたCOS細胞における、リン酸化-脱リン酸化を示すイムノプロットを表す図である。

第4図は、LARの野生型または変異体によるインスリンレセプターβ鎖の脱リン酸化を示すイムノプロットを表す図である。

- 5 第5図は、インスリンレセプターの野生型または変異型とLAR C/SとをコトランスフェクトしたCOS細胞におけるチロシンリン酸化を示すイムノプロットを表す図である。

第6図は、本発明の抗体YU2の分子量を示す、SDS-ポリアクリルアミドゲルを表す図である。

- 10 第7図は、本発明の抗体YU2のLARに対する免疫特異性を示すイムノプロットを表す図である。

第8図は、本発明の抗体YU2を用いた、CD45についてのイムノブロッティングによる分析結果を示す図である。

- 15 第9図は、LARとCD45の細胞内ドメインのアミノ酸配列の相同性を示す図である。

第10図は、インスリンレセプターおよびLARが関与する、リン酸化および脱リン酸化によって制御されるインスリンのシグナル伝達のカスケードを示す模式図である。

- 20 [発明を実施するための最良の形態]

[実験例1] LAR変異体によるインスリンレセプターのチロシンリン酸化、
ならびにLARとインスリンレセプターとの会合に関する検討

- 25 先ず、LARによるインスリンのシグナル伝達制御メカニズムを明らかにするために、LARのPTPドメインの触媒活性中心に存在するシステインをセリンに変換することにより作製した、変異型LARを用いるというストラテジーにより解析を進めた。

a. LAR、およびインスリンレセプターの発現ベクター

LAR発現ベクターとして、(a) LAR WT: ヒト野生型 LAR (配列番号: 3)、(b) LAR C/S: LAR-PTPドメイン 1の活性中心にあるシステイン (配列番号: 3のアミノ酸第1522位) を、配列番号: 3のヌクレオチド第49
5 83位のGをCに置換することによりセリンへと変換したもの、ならびに
(c) LAR DC/S: LAR C/Sにおける変異に加えて、さらにLAR-PTPドメイン
2のシステイン (配列番号: 3のアミノ酸第1813位) を、配列番号: 3
のヌクレオチド第5856位のGをCに置換することによりセリンへと変換し
たものの3種 (第1図(b)参照) を、pMT発現ベクターに組み込んだもの
1 0 (Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992およびStreuli M.
et al., *EMBO J.*, 9, 2399-2407, 1990を参照) を用いた。

一方、インスリンレセプターの発現ベクターは、(a) IR WT: 野生型、
および(b) IR K1018M: 野生型のインスリンレセプターのATP結合部位の、
第1018位のリジンをメチオニンに変換してチロシンキナーゼ活性を欠失
1 5 させたインスリンレセプター変異型の2種類の cDNAを、SR α プロモーター
の下流に組み込んだもの (Kanai F. *et al.*, *Biochemical
Biophysical Research Communication*, 195, 762-768, 1993を参照) を
用いた。

b. COS-7細胞へのトランスフェクション

2 0 COS-7細胞を 1.0×10^6 細胞数/8 mL/90 ϕ ディッシュとなるように10%
牛胎児血清添加 RPMI 1640培地 (日水製薬株式会社) に播種して 16時間
培養を行った後、LAR C/Sと IR WTの発現ベクターを DEAE-デキストラン
法を用いて COS-7細胞にコトランスフェクションした。用いたLAR C/Sは、
前記①(b)に記載のとおりに変異させることにより、*In vitro*でチロシン
2 5 ホスファターゼ活性が完全に欠失していることが明らかにされている
(Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 9, 2399-2407, 1990) ものである。

コトランスフェクションは、以下の手順に従って行った。先ず 2% FCS を含有する RPMI 1640 培養液 (グルタミン 0.3 g および カナマイシン 0.1 g を含む、RPMI 1640 培地 (日水製薬株式会社) 10.2 g/L、10% NaHCO_3 で pH 7.4 に調整) 4 ml に、40 μl の 10 mM クロロキンを加えた。この溶液 2 ml に、LAR 発現ベクター 5 μg および IR 発現ベクター 1 μg を加え、残りの溶液 2 ml には 16 μl の 100 mg/ml DEAE-デキストランを加えた。次いで双方の溶液をよく撹拌混合した。こうして調製した発現ベクター溶液 3.75 ml を、 1.0×10^4 細胞数/8 ml/ディッシュ となるように播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベーター内で 16 時間前培養しておいた COS-7 細胞に加えた。前培養と同様の条件で 4 時間培養した後、10% DMSO 溶液で 2 分間処理し、PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.4 mM KH_2PO_4) で洗浄後、10% FCS を含有する RPMI 1640 を 8 ml 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 に調整したインキュベーター内で 48 時間培養した。

1 5 c. インスリン刺激と細胞溶解液調製

トランスフェクション終了後の COS-7 細胞を血清無添加 RPMI 1640 培養液中で 16 時間培養し、 10^{-7} M インスリン (生化学工業社製) で一定時間、すなわち、0、1、5、15 および 30 分間の刺激を行った。但し 0 分刺激とは、インスリン刺激を行ったが、氷上に放置し、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートしなかったものである。インシュリン刺激開始より各時間経過後に、培養液をすべて吸い取り、直ちに PBS w/Inh. (チロシンホスファターゼインヒビター-含有 PBS: 1 mM バナジウム酸ナトリウム、5 mM フッ化ナトリウム、5 mM ピロリン酸ナトリウム、5 mM EDTA \cdot 2Na、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、4.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.4 mM KH_2PO_4) を 5 ml 加えた。PBS w/Inh. で細胞全体を洗浄してから液体を吸引除去し、細胞に溶解用バッファー (1% Nonidet P-40、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl

(pH7.4)、5 mM EDTA、10 mM ヨードアセタミド、10 mMフッ化ナトリウム、10 mM ピロリン酸ナトリウム、0.4 mM バナジウム酸ナトリウム、0.1 mM 酸化フェニルアルシン、1 mM ベンズアミジン、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル) を1ml 加え、セルスクレイパーを用いて細胞を
5 集めた。この細胞懸濁液を 1.5 mlチューブに移し 4 °Cで 30 分間インキュベートすることにより、細胞を完全に溶解させた。インキュベート後の液体を12,000 rpm、4 °Cにて10 分間遠心分離して得られた上清を、細胞溶解液として以下の実験に用いた。

d. 免疫沈降

- 10 前節 c. で得られた細胞溶解液につき、抗 LAR E-サブユニット抗体 (7.5 μ g の 11.1A と 7.5 μ g の 753.A との混合物 (Streuli M. *et al.*, *EMBO J.*, 11, 897-907, 1992 参照) を用いた免疫沈降を行った。前記細胞溶解液 1 ml に対してモックとして MOPC 21 (マウス IgG1 κ : Sigma 社製) を 15 μ g 加え、4 °C で 1 時間インキュベート後、 γ -bind (GammaBind Plus Sepharose: Pharmacia Biotech 社製) 20 μ l を加え、さらに 4 °C で 1 時間インキュベートすることにより前吸収を行った。4 °C、12,000 rpm にて 10 分間遠心分離を行い、上清 950 μ l を別のチューブに移した。抗 LAR E-サブユニット抗体を 15 μ g 加え、4 °C で 1 時間インキュベート後、 γ -bind を 20 μ l 加え、さらに 4 °C で 1 時間インキュベートした。12,000 rpm、4 °C にて 10 分間遠心分離後、沈査を 1 ml 溶解用バッファで 2 回、PBS w/Inh. で 1 回洗浄し、20 μ l の SDS サンプルバッファに懸濁した。これを沸騰水中で 5 分加熱し、電気泳動用の検体とした。

e. イムノブロッティング

- 25 上記検体を 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、トランスファー装置を用いて 400 mA で 4 時間ニトロセルロース膜

- (Schleicher & Schuell) に転写した。この膜を3% ウシ血清アルブミン溶液中において室温で 30 分間以上インキュベートすることによりブロッキングを行った。充分量の TBS-T (Tween 20含有TBS: 10 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) で10 分間、2 回以上洗
- 5 浄後、TBS-T で50,000倍に希釈した抗リン酸化チロシン抗体 (4G10、UBI社)、抗LAR E-サブユニット抗体または抗インスリンレセプター β 鎖抗体 (UBI社) を加え、室温において1 時間振盪した。充分量の TBS-T で 5 分間、3 回以上洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体 (西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG: Santa Cruz Biotechnology社製)
- 10 1.5 ml を含むTBS-T溶液を15 ml 加え、室温において1 時間振盪した。充分量の TBS-T で5 分間、3 回以上洗浄後、発光試薬セット (和光純薬工業株式会社製) を用いてケミルミネッセンス法により、各抗体と結合する蛋白質のバンドを検出した。

1. 結果

- 15 このように、LAR C/SとIR WTをCOS-7細胞にコトランスフェクションし、インスリンで一定時間刺激した後に作製した細胞溶解液を抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行ったところ、インスリン刺激 1分でインスリンレセプター β 鎖のチロシンリン酸化および 85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化が認められた。これらのチロシンリン酸化は、インスリン刺激後 30分においても
- 20 持続して認められた (第2図A参照)。

- また、抗 LAR E-サブユニット抗体 (第2図B)、抗インスリンレセプター β 鎖抗体 (第2図C) および抗リン酸化チロシン抗体 (第2図A) を用いたイムノブロッティングの結果、LARとインスリンレセプターがインスリンレセプターのチロシンリン酸化の有無により会合することも明らかとなった。
- 25

〔実験例2〕種々のLARによるインスリンレセプターのチロシン脱リン酸化の検討(1)

次に、LAR WT、LAR C/SおよびLAR DC/Sと IR WTを用いて同様に COS-
5 7細胞にコトランスフェクションし、インスリンで 5分間刺激後、抗
LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降し、沈降物について各種抗体を用い
たイムノブロッティングを行った。その結果、インスリンレセプターと
LAR WTをコトランスフェクションしたものは LAR C/SやLAR DC/Sをコト
ランスフェクションしたもの比べると、インスリンレセプターβ鎖や
10 85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化はほとんど検出されなかった(第3図
A参照)。

また、この実験において LAR (第3図C) やインスリンレセプター
(第3図D) の発現量は、それぞれのトランスフェクタントにおいてほ
ぼ同一であったことより、LAR WTはインスリンレセプターβ鎖や 85
15 kDa蛋白質のリン酸化チロシンを脱リン酸化することが示された。

また、抗 LAR E-サブユニット抗体による免疫沈降物を抗インスリンレ
セプターβ鎖抗体でイムノブロッティングしたところ、LAR DC/Sをコト
ランスフェクションしたものでは LAR WTや LAR C/Sをコトランスフェク
ションしたものに比較すると、インスリンレセプターβ鎖のバンドが明
20 らかに弱かった(第3図B)。

この結果は、LAR WTや LAR C/Sに比べて、LAR DC/Sとインスリンレセ
プターの会合が弱いことを示すものである。LAR C/Sと LAR DC/Sの違い
は、ホスファターゼドメイン 2の1813番目のアミノ酸のみであることか
ら、チロシンホスファターゼ活性を示さず基質との結合に関与すると推
25 測されてきたこのドメイン 2が、LARとインスリンレセプターとの結合に
機能していることが明らかとなった。

〔実験例3〕種々のLARによるインスリンレセプターのチロシン脱リン酸化の検討(2)

さらに、インスリンレセプターのチロシン脱リン酸化がLARに結合したもののみであるのか、またはインスリンレセプター全てで確認されるのかを検討するために、このコトランスフェクタントの細胞溶解液を電気泳動後、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行った。その結果、LAR WTを導入したもののみ、インスリンレセプターのチロシン脱リン酸化が顕著に認められた(第4図参照)。

10

〔実験例4〕LAR C/S存在下でのインスリンレセプターのチロシンリン酸化の検討

次に、85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化がインスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性によるものであるかを明らかにするため、LAR C/SとIR WTまたはインスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性を欠失させたIR K1018M (IR MT) をCOS-7細胞にコトランスフェクションした。5分間インスリン刺激を行った後、抗LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロッティングを行った(第5図参照)。その結果、IR WTとコトランスフェクションしたものではインスリン刺激によりインスリンレセプターβ鎖および85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化が認められたが、IR K1018Mとコトランスフェクションしたものではこれらのリン酸化が全く認められなかった。

20

以上の結果より、インスリンがインスリンレセプターに結合するとインスリンレセプターのβ鎖の速やかなチロシンリン酸化が起こり、さらにインスリンレセプターチロシンキナーゼが85 kDa蛋白質のチロシンリン酸化を引き起こすことが明らかとなった。

25

従って、この 85 kDa蛋白質は、インスリンレセプターと結合していることが確認された LARの P-サブユニットである可能性が考えられた。

[実施例 1] 抗チロシンホスファターゼ P-サブユニット抗体の作製

- 5 以下の手順に従って、抗チロシンホスファターゼ P-サブユニットの抗体を作製した。

a. 免疫原の調製

- 免疫原として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ-LAR融合蛋白質 (GST-LAR) を用いることとした。LAR P-サブユニットの細胞膜貫通部分
10 の終点より細胞質側すべてにあたる 607 アミノ酸に相当するcDNA (配列番号: 1、3467塩基対) をpGEX-2T ベクター (Pharmacia Biotech社製) のBamHI/EcoRIサイトに組み込んだ発現ベクターを用いて、常法に従い *E. coli* AD202 を形質転換した。この大腸菌を LB (Amp.+) 寒天培地 (アガー7.5 gを含む後述のLB (Amp.+) 培地) で一晚培養した後、シン
15 グルコロニーをLB (Amp.+) 培地 (トリプトン10 g/L、酵母エキス 5 g/L、NaCl 5 g/L、5 N NaOH 0.2 ml/L、アンピシリンを 50 μ g / ml含有) 50 ml に接種し、さらに一晚培養した。これをLB (Amp.+) 培地 500 mlに接種し、37°C で 600 nm における吸光度が約 1.0 になるまで培養し、1 M IPTG (イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノシド、和
20 光純薬工業社製) 50 μ l を加え、25°C で一晚培養した。この培養物を 3,000 rpm、4°C で15 分間遠心分離し、沈澱した菌体を NETN (0.5 % Nonidet P-40、1 mM EDTA、20 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl) 50 ml に懸濁させた。その後、1 分間 超音波処理、氷上 1 分間の操作を 2 回繰り返す、14,000 rpm、4°C で20 分間遠心分離して上清を得た。
25 この大腸菌溶解液 10 ml に グルタチオンセファロースビーズ懸濁液 (Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech社製) をNETNで3回洗

- 5 浄し、50%NETN懸濁液として調製)を100 μ l 加え、室温で30分間インキュベートした。得られた懸濁液を3,000 rpm、4°C で5分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿したグルタチオンセファロースビーズをNETNで2回、PBSで1回洗浄し、SDS sampleバッファー (125 mM Tris-HCl pH 6.8、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、5% 2-メルカプトエタノール) を100 μ l 加え、沸騰水中で10分間加熱して GST-LAR融合蛋白質を溶出した。ビーズを除いた溶出液を、Centricon-10 (アミコン社製) に移し、3,000 rpm、45分間、4°C で遠心濃縮した。緩衝化を目的として1 ml のPBSを加え、ふたたび 3,000 rpm、45分間、4°C で遠心濃縮した。この緩衝化の操作をさらに 2 回繰り返して得られたものを、免疫用の抗原溶液とした。抗原蛋白質の精製および濃縮は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。
- 10

- 一方、最終免疫では静脈内投与を行うため、上記とは異なる方法で抗原溶液を調製した。GST-LAR融合蛋白質を発現している前記大腸菌溶解液とグルタチオンセファロースビーズをインキュベートし、遠心分離後、沈殿したビーズを NETNで2回、PBSで3回洗浄した。次いで GSH 溶出バッファー (20 mM グルタチオン、1M Tris-HCl、pH 9.6) を100 μ l 加え、10分間室温で軽く攪拌して GST-LARを溶出させた。3,000 rpm、4°C で5分間遠心分離して上清を回収する操作を計 3 回行い、全溶出液を生理食塩水中 4°C で2日間透析したものを、静脈内投与用抗原溶液とした。
- 15
- 20

b. 免疫処置

- 6週齢の雌性 Balb/c マウス 8 匹に対し、プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン、Sigma社製)を 0.5 ml/匹で腹腔内投与した。2週間後、腹腔内免疫用抗原溶液をフロイント完全アジュバント (GIBCO社製) と 1 : 1 で混和しエマルジョン化したものを、GST-LAR融合蛋白質が約10 μ g/匹となるよう腹腔内投与した。以後、ほぼ2週間ごとに4回、
- 25

腹腔内免疫用抗原溶液とフロイント不完全アジュバント (GIBCO社製) との 1 : 1 混和物を GST-LAR が約 30~70 $\mu\text{g}/\text{匹}$ となるよう調製し、腹腔内投与した。4 回目の免疫の 4 日後に眼底静脈より採血し、血清中の抗体価を ELISA 法により測定した。

5 c. ELISA

静脈内免疫用抗原と同様の方法で調製した GST-LAR および GST のみの蛋白質溶液を、それぞれ精製水に対して 4℃ で一晚透析した。これを、PBS で 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、50 μl /ウェルで ELISA プレート

- (Falcon 3911 MicroTest \cdot TM Flexible Assay Plate) に 1 時間吸着させた。洗浄用バッファー (0.05% Tween20 を含む PBS) で 5 回洗浄後、5% スキムミルク (2.5 g のスキムミルクを 50 ml の PBS に溶解して調製) でブロッキングを行った。これを洗浄後、前節 b で得られた血清を血清希釈用バッファー (0.25% BSA を含む PBS) で 16,000 倍に希釈し、50 μl /ウェルずつ加え、湿箱中 1 時間インキュベートした。プレートを 1 5 洗浄後、1000 倍希釈 HRP 標識抗マウス IgG 抗体を 50 μl /ウェルずつ加え 1 時間インキュベートした。洗浄用バッファーで 4 回、PBS で 1 回洗浄後、o-フェニレンジアミン (和光純薬工業社製) をクエン酸緩衝液 (5.6325 g クエン酸一水和物、18.35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を精製水に溶解し、500 ml として調製) に 1 mg/ml の濃度で溶解させた基質溶液を 2 0 μl /ウェルとなるように加え、30 分間反応させた後、50 μl の 10% H_2SO_4 を加え反応を停止した。このうち 50 μl を測定用 96 ウェルプレート (住友ベークライト社製) に移して 450 nm の吸光度を測定した。

d. 細胞融合

- 上記 ELISA の結果より GST-LAR に対する抗体価の上昇が認められたマウス 2 5 2 匹に静脈内投与により最終免疫を行い、その 3 日後に脾臓を摘出して、常法により脾細胞を調製した。

細胞融合のためのparent cellは、事前に 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の 8-アザグアニンを含む培地で選択し、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 欠損株であることを確認したBalb/c マウス由来ミエローマ細胞株 NS1 を用いた。 2×10^7 細胞数のNS1細胞と 1×10^6 細胞数の脾細胞に対し、 ClonaCell (商標名) - HY Hybridoma Cloning Kit (StemCell Technologies Inc.) を用いて細胞融合およびクローニングを行った。

クローニングされたハイブリドーマ培養上清のスクリーニングは、静脈内免疫用抗原と同様の方法で調製したGST、GST-LARまたはGST-CD45 (Iwukawa, T. et. al. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10928-10932, 1994) の蛋白質溶液 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を結合させたプレートにて、ハイブリドーマ培養上清 $50 \mu\text{l}$ について前節 c) における ELISA法に準じて行った。このELISA法において、GSTを結合させたウェルには免疫反応を示さず、GST-LARまたはGST-CD45を結合させたウェルに免疫反応性を示すハイブリドーマを選択した。なお、クローニングされたハイブリドーマの継代培養は、10% ウシ胎児血清 (GIBCO社製) を含有するRPMI 1640 培養液 (日本製薬社製) で行った。

このように、HAT選択されたハイブリドーマの培養上清を ELISA法によりスクリーニングしたところ、抗体産生能、増殖能とも安定したクローニンYU2が得られた。

このハイブリドーマ細胞YU2は、1998年5月7日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に所在の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、その受託番号はFERM BP-6344である。

e. モノクローナル抗体のタイピング

上記 d) で得られたハイブリドーマ細胞YU2の培養上清 0.5 ml を 4.5 ml の TBS-T で希釈し、希釈液のうち 3 ml についてMouse monoclonal

antibody isotyping kit (Amersham International plc. 製) を用いて、アイソタイプを調べた。その結果、抗体のアイソタイプはIgG1 κ であることが判った。

f. モノクローナル抗体の調製と精製

- 5 6 週齢の雌性 Balb/c マウスに対し、0.5 ml / 匹のプリスタンを腹腔内投与し、その10 日後に、上記 d のクローニングで得られたハイブリドーマ細胞YU2を、1 匹あたり $2.5 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^7$ 細胞数/0.5 ml / 匹で腹腔内へ注入した。10日後ごろから、マウスの腹部肥大を認めたため、20ゲージの注射針を用いて数回にわたり腹水を採取した。採取した腹水
- 10 は、1,000 rpm、4 °Cにて5 分間遠心分離し、上清と沈殿物とに分けた。上清は、37 °Cで30 分間処理した後、4 °Cに一晚静置した。12,000 rpm、4°Cにて10 分間遠心分離し、得られた上清 1.5 ml よりアフィニティークラムHiTrap ProteinG (Pharmacia Biotech社製) を用いてモノクローナル抗体YU2を精製した。得られた抗体溶液の280 nm における吸光度を
- 15 測定し、マウスIgG の分子吸光係数より抗体濃度を算出した。

- さらに、このモノクローナル抗体YU2につき、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上の移動度からそれぞれの見かけの分子量を明らかにした。この結果を第6図に示す。第6図に明らかなように、モノクローナル抗体YU2は、約48 kDaのH鎖と約25 kDaのL鎖を含み、約146 kDaの分子量
- 20 を有していた。

〔実施例2〕モノクローナル抗体の特異性の検討(1)

- 実験例1. a およびb に記載した通り、LAR WTの発現ベクターをCOS-7細胞にトランスフェクションした。その細胞溶解液について、実施例1
- 25 で得られた精製モノクローナル抗体を用いて免疫沈降後、イムノブロッティングを行った。抗LAR E-サブユニット抗体(前記)、抗CD45抗体

(Santa Cruz Biotechnology社製、35-76) およびモノクローナル抗体 YU2はすべてIgG1サブクラスに属するので、免疫沈降の対照としてMOPC 21を用いた。

5 係るCOS-7細胞へのLAR強制発現系を用いた解析により、抗 LAR E-サブユニット抗体で免疫沈降後、モノクローナル抗体YU2は、LAR P-サブユニットに相当する 85 kDaとプレカーサーに相当する約 200 kDaの蛋白質を認識した (第7図B参照)。

さらに、LARをトランスフェクションした COS-7細胞の細胞抽出液をこれらの抗体 (IgG1、IgG2bまたはYU2) により免疫沈降後、LAR E-サブユニットを認識する抗体でイムノブロッティングを行ったところ、YU2の抗体で免疫沈降したもののみ LAR E-サブユニットに相当する 150 kDaと、
10 プレカーサーに相当する約 200 kDaの蛋白質が検出された (第7図A)。

以上の結果より、モノクローナル抗体YU2は、LARのP-サブユニットの免疫沈降およびイムノブロッティングに利用可能であることが明らかとなった。
15

一方、YU2はGST-CD45 (Furukawa T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10928-10932, 1994) を抗原とした ELISAでも反応性を示したことから、LARとCD45との共通抗原 (おそらく、双方に保存されている PTPドメイン内の配列) をエピトープとして認識していることが推察
20 された。

[実施例3] モノクローナル抗体特異性の検討 (2)

モノクローナル抗体YU2の特異性をさらに調べるために、実験例1に記載したと同様の手順に従ってCOS-7細胞に CD45を強制発現させ、その細胞抽出液を YU2を用いてイムノブロッティング解析を行ったところ、約
25 200 kDaと約 180 kDaの位置にバンドが確認された (第8図参照)。

市販の抗CD45抗体によるリブローブでも、同じ位置にバンドが検出されたので、これらのバンドは CD45であることが明らかとなった。

5 以上実施例 2 および 3 の結果より、ELISA法によるハイブリドーマのスクリーニングにおいて LARおよびCD45の細胞内ドメインの双方に反応性を示すクローンとしてピックアップされた YU2は、イムノブロッティングでも CD45を認識できることが確認された。

LARとCD45のアミノ酸配列の細胞内ドメインの相同性を第 9 図に示す。図中、双方のアミノ酸配列間で、「*」は同一アミノ酸を示し、「・」は類似アミノ酸を示す。LARと CD45の細胞内ドメインのうちホスファターゼドメイン 1以降 C末端までのアミノ酸配列を比較すると、39.4%の相同性を有していることが明らかになっている。なかでも、ドメイン 1 内のチロシンホスファターゼ活性を担うコンセンサス配列周辺にあたる 12アミノ酸 (Val-Val-His-Cys-Ser-Ala-Gly-Val-Gly-Arg-Thr-Gly、配列番号：4 (配列番号：1 のアミノ酸第245～256位)) は、完全に一致している (第 9 図中、白抜き文字部分)。ポリペプチドが抗原決定基となりうるには、8～10アミノ酸程度が必要といわれていることから、YU2が配列番号：4 で示される12アミノ酸を含むホスファターゼのコンセンサス配列をエпитープとして認識することも考えられる。

第 9 図において、LARおよびCD45の細胞内ドメインの、他の既知のPTP (すなわち、PTP α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 σ 、 μ 、 κ 、 η 、 ζ 等) とのコンセンサス配列部分 8 箇所に関心を付した。この 8 箇所のコンセンサス配列は、ドメイン 1 およびドメイン 2 における、4 種の配列 (第 11 図、(1)～(4)) の反復であり、かかる 4 種の配列の詳細は以下の通りである。

- (1) Phe-Trp-(Arg/Glu/Ile)-Met-(Val/Ile/Cys)-Trp (配列番号：5)
- 2 5 (2) Lys-Cys-(Ala/Asp)-(Gln/Glu/Lys)-Tyr-Trp-Pro (配列番号：6)
- (3) Trp-Pro-Asp-(His/Phe)-Gly-Val (配列番号：7)

(4) Pro-Xaa-(Ile/Val)-(Ile/Val)-His-Cys-Xaa-Ala-Gly-Xaa-Gly-Arg
-(Thr/Ser)-Gly (配列番号：8)

配列番号：4で示されるLARとCD45との前記同一配列は、ドメイン1の上記コンセンサス配列(4)に含まれている。このようなPTPのコンセンサス

- 5 配列をエピトープとして認識しうる本発明の抗体は、PTPの解析および定量、新規PTPの同定、検出および単離精製などに有効に利用できるものと考えられる。

- また、第10図に示すように、インスリンがインスリンレセプター α 鎖に結合すると、インスリンレセプターの β 鎖が自己リン酸化されチロシンキナーゼ活性が上昇する。このチロシンキナーゼの働きにより、最終的にグルコースの取り込み、糖代謝や細胞増殖といったインスリン作用が発現する。本出願人らは、この活性化されたインスリンレセプターは、LARによってチロシン脱リン酸化を受けて不活性化状態に戻ることを明らかにした(1998年6月5日出願の国際出願、PCT/JP98/02542)。さらに、(1) インスリンレセプターチロシンキナーゼはLARの細胞内ドメインをチロシンリン酸化すること、(2) かかるリン酸化がLARの基質特異性の決定か、ホスファターゼ活性の上昇に関与していること、および(3) リン酸化チロシンをLARが自己脱リン酸化することによりその酵素活性を制御していることなどの可能性が示唆され、LARの酵素活性の促進がインスリン抵抗性の原因となりうることを分子レベルで例証している。
- 10 本発明の抗体によって、このようにLARやCD45のみならず他のPTPが関与する、リン酸化・脱リン酸化等に関わるシグナル伝達機構や種々の制御機構を解明することが可能となる。

25 [産業上の利用可能性]

本発明によって提供される、PTPの細胞内ドメインに対する抗体は、

LARまたは、CD45とLARの双方の細胞内ドメインに結合することができる。

これら本発明の抗体は、PTPのホスファターゼドメインのコンセンサス配列を認識すると考えられるため、PTPの解析および定量、新規PTPの同定および検出、ならびにクローニング等による新規ホスファターゼの取

- 5 得に有用である。そして、これらの抗体は、インスリンのシグナル伝達機構や種々の制御機構を解明する極めて有用なツールになり得る。また、インスリン抵抗性および NIDDMに有用な診断方法を開発し、さらにはインスリン抵抗性を基盤とするシンドロームXの種々の病態の予防、治療等の処置および診断、そして動脈硬化および心疾患発症の予防および診断

- 10 に応用できる。

請求の範囲

1. 2種以上のプロテインチロシンホスファターゼの細胞内ドメインに対して特異性を有する抗体。
- 5 2. 前記プロテインチロシンホスファターゼのうち少なくとも1種が受容体型プロテインチロシンホスファターゼである請求の範囲第1項記載の抗体。
3. 前記受容体型プロテインチロシンホスファターゼが、LARおよび/またはCD45である請求の範囲第2項記載の抗体。
- 10 4. 前記受容体型プロテインチロシンホスファターゼが、LARおよびCD45である請求の範囲第2項記載の抗体。
5. プロテインチロシンホスファターゼのホスファターゼドメインに対して特異性を有する請求の範囲第1乃至4項のいずれかに記載の抗体。
6. 配列番号：1で示される塩基配列によってコードされるポリペプチドまたはその断片を抗原として調製される請求の範囲第1乃至5項のいずれかに記載の抗体。
- 15 7. 前記抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1乃至6項のいずれかに記載の抗体。
8. 免疫原としてプロテインチロシンホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチドとを含む融合タンパク質を用いることによって調製される請求の範囲第1乃至7項のいずれかに記載の抗体。
- 20 9. 免疫原としてGST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質を用いることによって調製される請求の範囲第1乃至7項のいずれかに記載の抗体。
- 25 10. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、GSTをコードする遺伝子領域およびLARのホスファターゼドメインをコードする遺

伝子領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を20～30℃にて16～24時間培養し、その培養液および／または菌体から融合タンパク質を単離することによって製造されるものである請求の範囲第9項記載の抗体。

- 5 11. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、さらにグルタチオンを有する担体へのアフィニティーによって精製されるものであって、該担体からの融合タンパク質の溶出が、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施されるものである請求の範囲第10項記載の抗体。
- 10 12. 前記融合タンパク質を免疫原として調製される抗体が、該融合タンパク質を用いてスクリーニングされるものである請求の範囲第8乃至11項のいずれかに記載の抗体。
13. 受託番号がFREM BP-6344であるハイブリドーマにより産生される、プロテインチロシンホスファターゼの細胞内ドメインに対して特異性を有するモノクローナル抗体。
- 15 14. 約146 kDaの分子量を有する請求の範囲第7乃至13項のいずれかに記載の抗体。
15. 請求の範囲第7乃至12項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞系。
- 20 16. 受託番号がFREM BP-6344であるハイブリドーマ細胞系。
17. 請求の範囲第1乃至14項のいずれかに記載の抗体の調製方法であって、免疫原としてプロテインチロシンホスファターゼドメインとその他のタンパク質またはポリペプチドとを含む融合タンパク質を用いることを特徴とする方法。
- 25 18. 請求の範囲第1乃至14項のいずれかに記載の抗体の調製方法であって、免疫原としてGST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質を

用いることを特徴とする方法。

- 1 9. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、GSTをコードする遺伝子領域およびLARのホスファターゼドメインをコードする遺伝子領域を含む発現ベクターを形質転換またはトランスフェクトした大腸菌を20～30℃にて16～24時間培養し、その培養液および／または菌体から融合タンパク質を単離することによって製造されるものである請求の範囲第18項記載の方法。

20. 前記GST-LARホスファターゼドメイン融合タンパク質が、さらにグルタチオンを有する担体へのアフィニティによって精製されるものであって、該担体からの融合タンパク質の溶出が、界面活性剤の存在下に煮沸することによって実施されるものである請求の範囲第19項記載の方法。

21. 前記融合タンパク質を免疫原として調製される抗体が、該融合タンパク質を用いてスクリーニングされるものである請求の範囲第17乃至20項のいずれかに記載の方法。

22. 新規プロテインチロシンホスファターゼを単離するための方法であって、

20. プロテインチロシンホスファターゼをスクリーニングする工程を含み、該プロテインチロシンホスファターゼのスクリーニング工程において請求の範囲第1乃至14項のいずれかに記載の抗体が使用されることを特徴とする方法。

23. 前記スクリーニングが、cDNAライブラリーの発現スクリーニングである請求の範囲第22項記載の方法。

24. プロテインチロシンホスファターゼおよび／またはプロテインチロシンホスファターゼ由来分子の定量方法であって、

請求の範囲第1乃至14のいずれかに記載の抗体を使用して、被検試

料中に含まれるプロテインチロシンホスファターゼのタンパク質、および／または少なくともプロテインチロシンホスファターゼの細胞内ドメインの一部を含む断片もしくはポリペプチドの量を測定することを特徴とする定量方法。

- 5 25. 前記抗体が、イムノブロッティング、免疫沈降またはELISAのいずれかにおいて使用される請求の範囲第24項記載の定量方法。

26. プロテインチロシンホスファターゼおよび／またはプロテインチロシンホスファターゼ由来分子の活性を定量するための方法であって、

- 10 請求の範囲第1乃至14項のいずれかに記載の抗体を用いて被検試料中に含まれるプロテインチロシンホスファターゼのタンパク質、および／または少なくともプロテインチロシンホスファターゼの細胞内ドメインの一部を含む断片もしくはポリペプチドを単離し、単離されたタンパク質、断片またはポリペプチドの活性を測定する工程を含む方法。

- 15 27. 前記単離工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が用いられる請求の範囲第26項記載の方法。

28. プロテインチロシンホスファターゼおよび／またはプロテインチロシンホスファターゼ由来分子を生産するための方法であって、

- 20 請求の範囲第1乃至14項のいずれかに記載の抗体を用いてプロテインチロシンホスファターゼのタンパク質、および／または少なくともプロテインチロシンホスファターゼの細胞内ドメインの一部を含む断片もしくはポリペプチドを単離する工程を含む方法。

- 25 29. 前記単離工程において、前記抗体を結合させた担体によるアフィニティークロマトグラフィーおよび／または免疫沈降が用いられる請求の範囲第28項記載の方法。

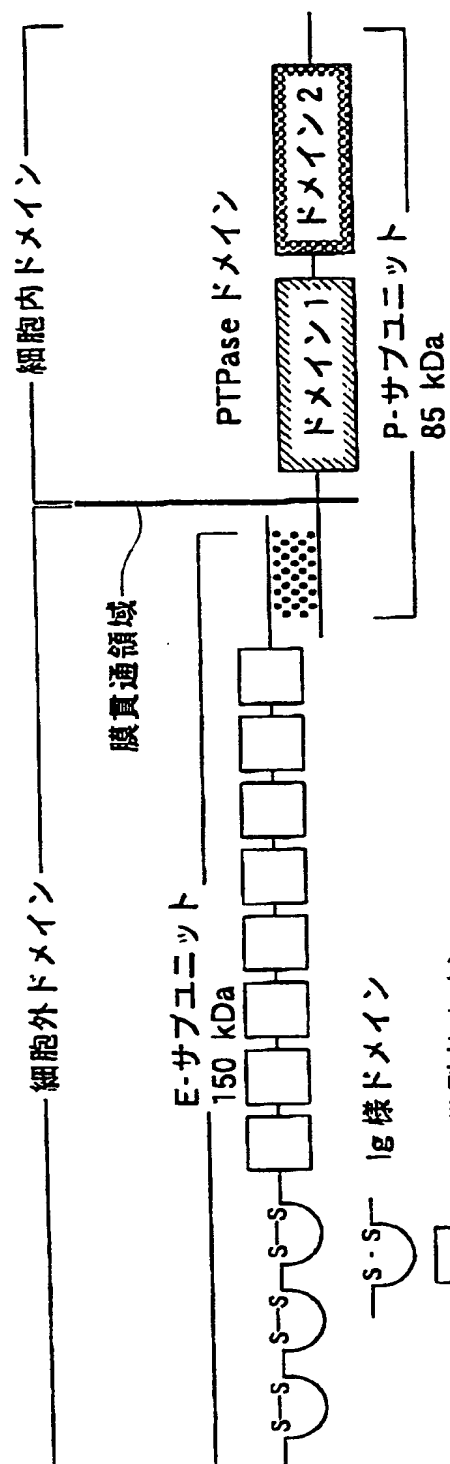
30. プロテインチロシンホスファターゼおよび／またはプロテインチ

ロシンホスファターゼ由来分子の組織内における存在を確認するための方法であって、

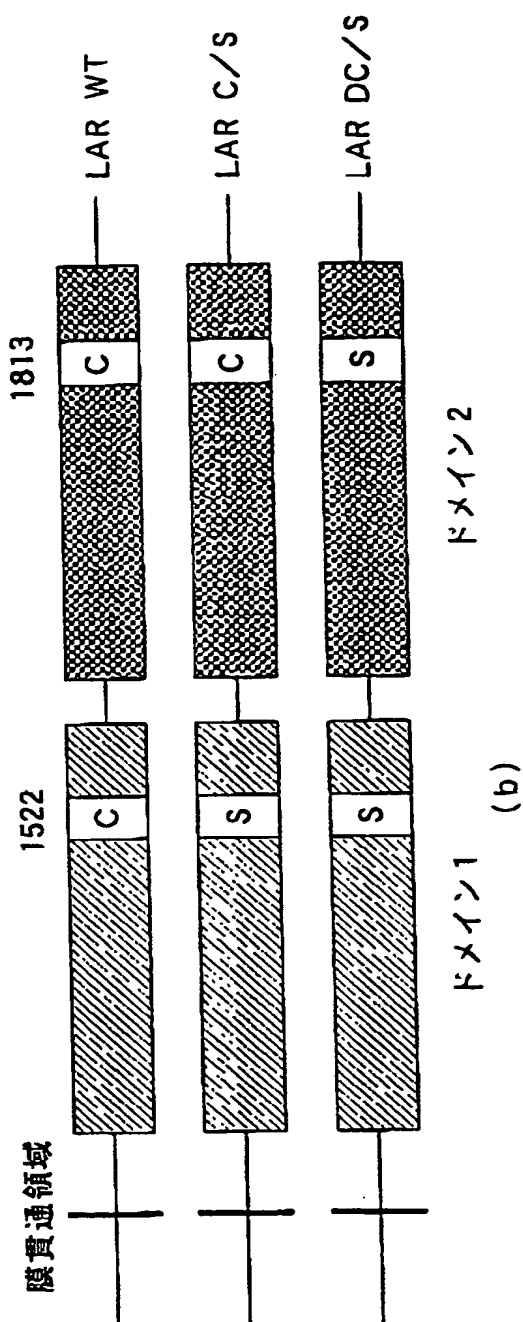
- 請求の範囲第 1 乃至 14 項のいずれかに記載の抗体を用いて免疫組織学的検査を行い、プロテインチロシンホスファターゼのタンパク質、および/または少なくともプロテインチロシンホスファターゼの細胞内ドメインの一部を含む断片もしくはポリペプチドを検出する工程を含む方法。

第1図

1/10

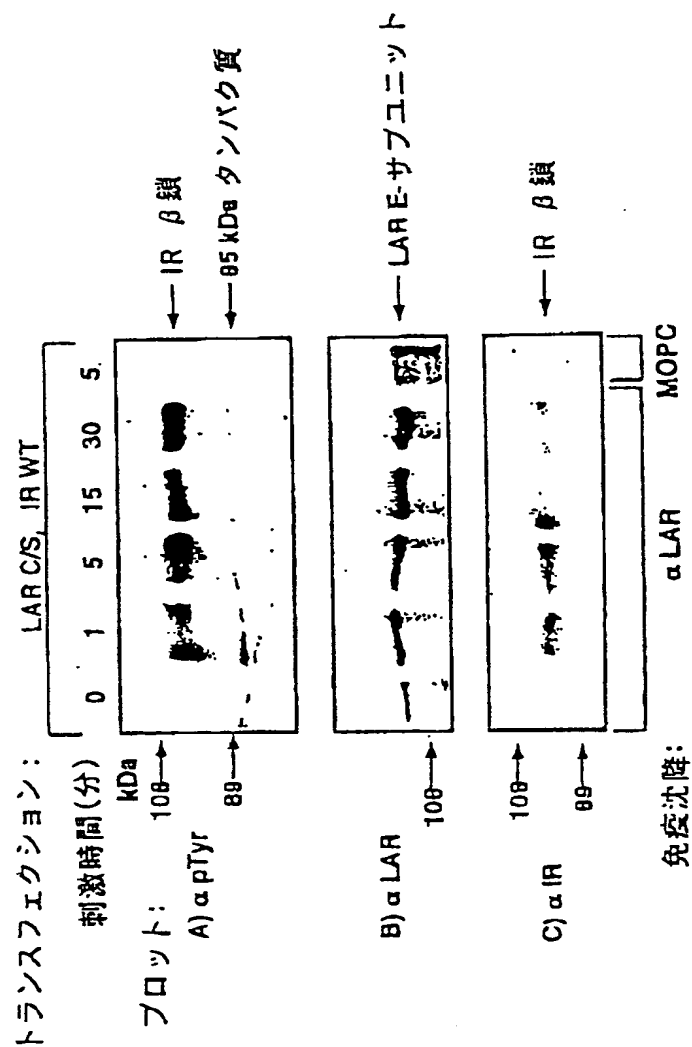


(a)

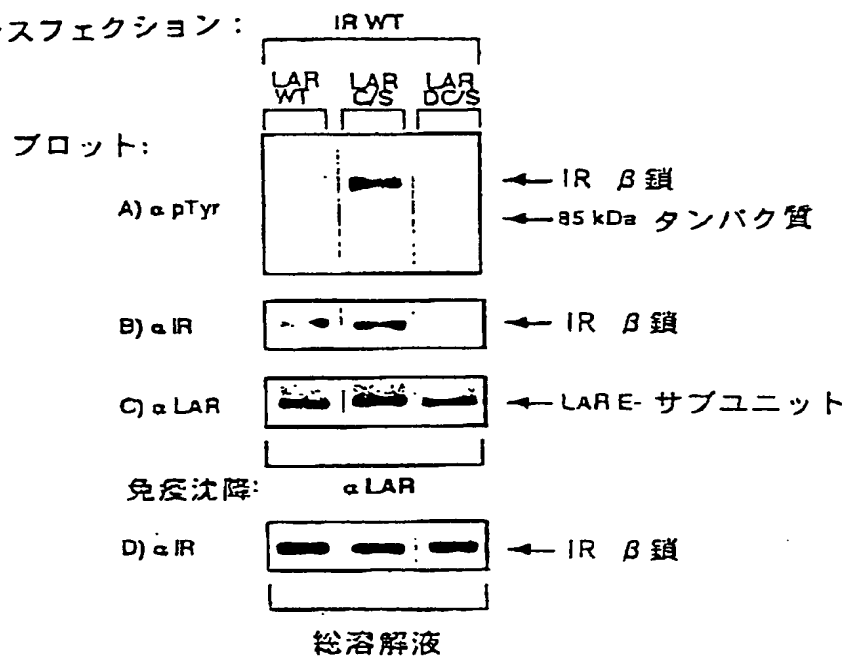


(b)

第2図



トランスフェクション:

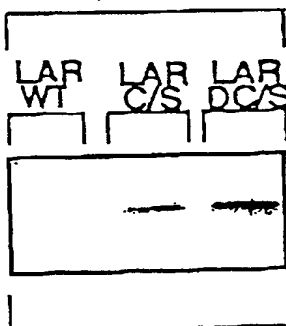


第4図

4/10

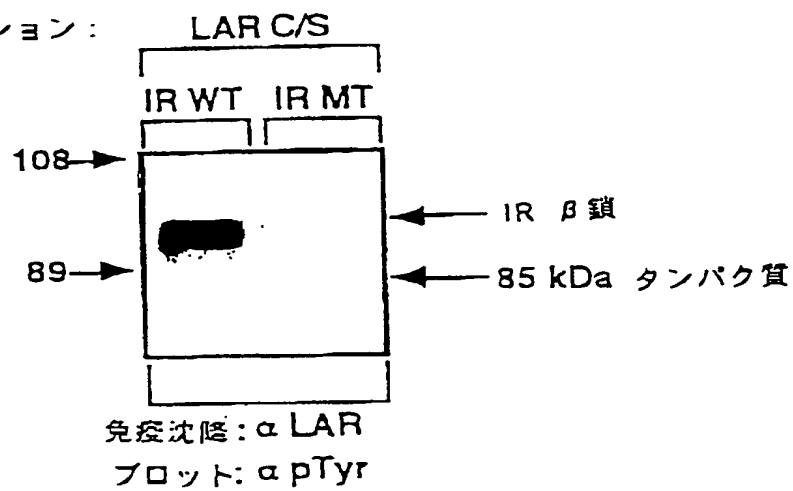
トランスフェクション:

IR WT

プロット: α pTyr← IR β 鎖

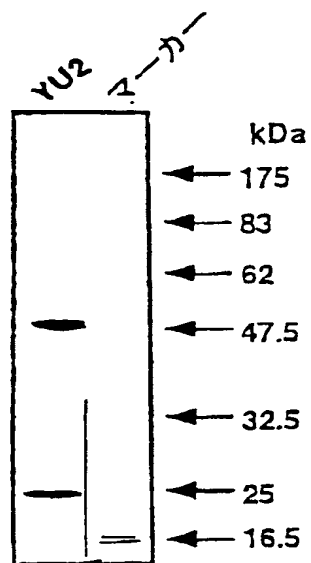
総溶解液

トランスフェクション:



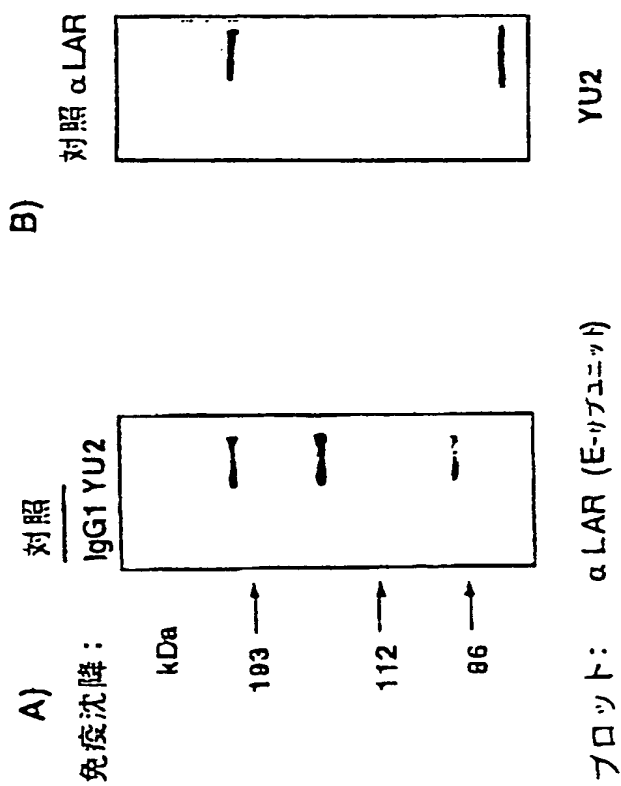
6/10

第 6 図



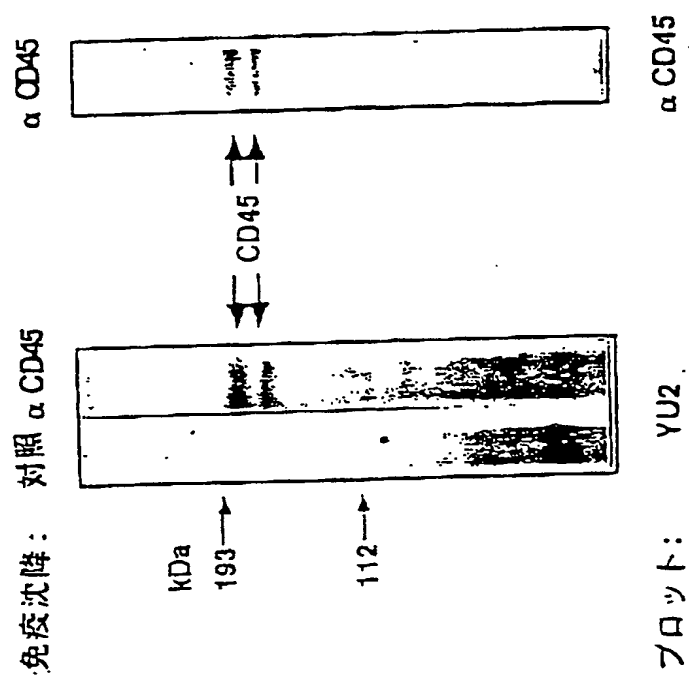
第7図

7/10



8/10

第8図



第9図

9/10

LAR : SNLEVNKPKNRYANVIAVDHRSVILTSIDGVPGSYINANYIDGYRKQAYIATQGPLPE 60
 CD45 : ARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGRDE 60
 * - ***** *

(1) (2)
 LAR : TMGDFWRMVEQRTATVVMTRLEEKSRVKCDQYWPAR—GTETCGLIQVTLLDTVELAT 118
 CD45 : TVDDFWRMVEQKATVIVMVTRCEEGRNKKCAEYWPSEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPD 120
 * - ***** *

(3)
 LAR : YTVRTFA—LHKSSESSEKRELQFQFMAWPDHGVPEYPTPILAFRRVKACNPLDAGPMVV 177
 CD45 : YIIQKLNIVNKKKATGREVTHIOFTSWPDHGVPEDPHLLKLRRRVNAFNSFFSGPIVV 180
 * - ***** *

(4)
 LAR : HCSAGVGRGCFIVIDAMLERMKHEKTVDIYGHVTCMRSQRNYMVQTEDQYVFIHEALLE 237
 CD45 : HCSAGVGRGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGVVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVE 240
 ***** *

LAR : AATCCHTEVPARNLYAHIQKLGQVPPGESVTAMELEFKLLASSKAHTSRFISANLPCNKF 297
 CD45 : YNQFGETEVNLSLHPYLHNMKRDPPEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEE—NKS 299
 * - ***** *

LAR : KNRLVNIMPYELTRVCL—————QPIRGVEGSDYINASFLDGYRQQK 338
 CD45 : KNRRNSVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPE 359
 *** *

(1) (2)
 LAR : AYIATQGPLAESTEDFWRMLWEHNSTIIVMLTKLREMGREKCHQYWPAERSARYQYFVVD 398
 CD45 : VMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVIVMLTELKHGDQELCAQYWGEGKQT—YGDIEVD 418
 * - ***** *

(3)
 LAR : PMAEYNMPQYILREFKVTDARDQSRRTIRQFQFTDWEQGVPKTGEGFIDFIGQV— 453
 CD45 : LKDTDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQKLP 478
 * - ***** *

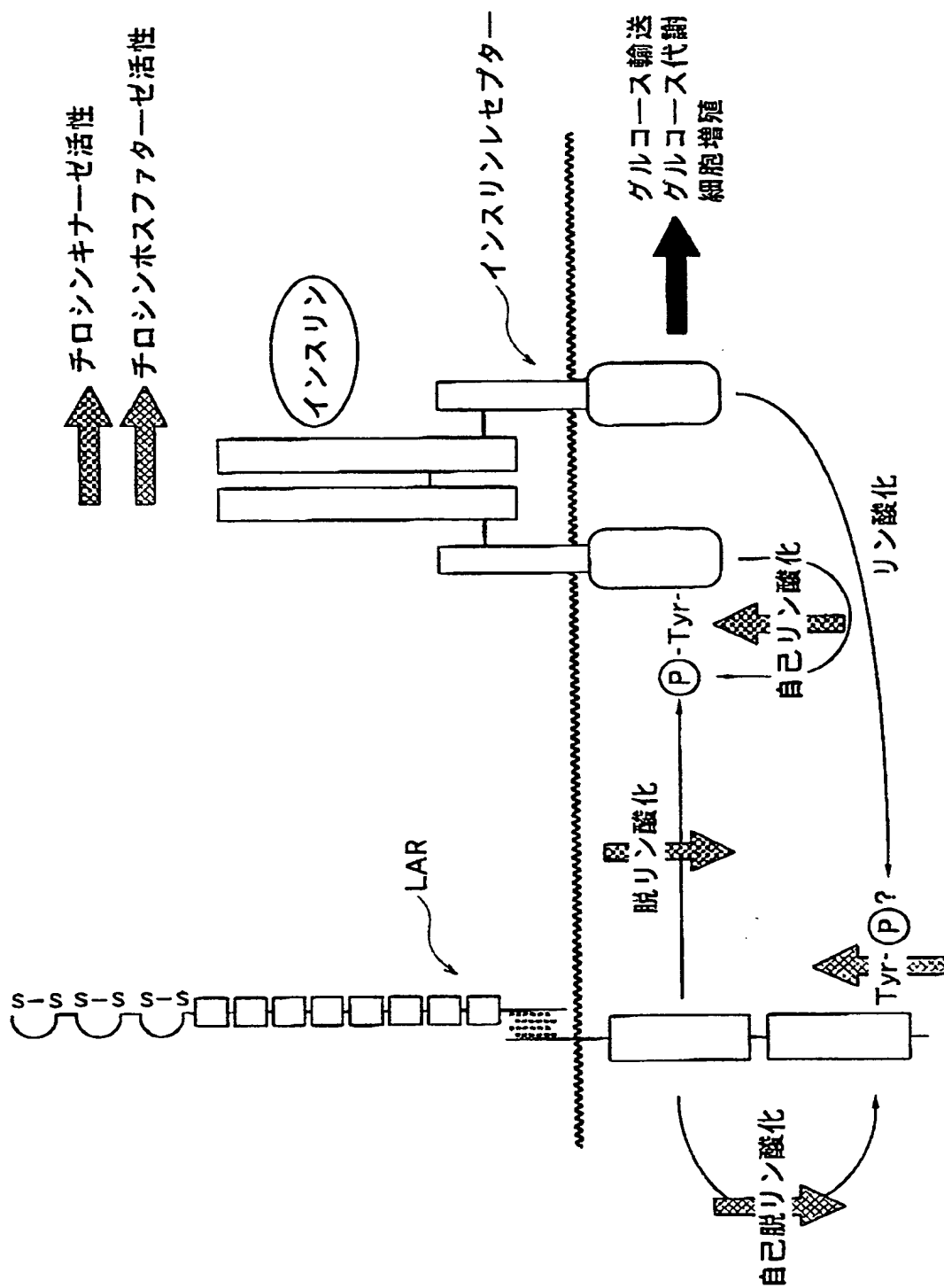
(4)
 LAR : —HKTKEQFGQDGPITVHCSAGVGRGQVFITLSIVLERMRYEGVVDMFQTVKTLRTQRP 510
 CD45 : QKNSSEGNKHHKSTPLLHCRDGSQQTGIFCALLNLLSAETEEVVDIFQVVKALRKARP 538
 * - ***** *

LAR : AMVQTEDQYQLCYRAALEYLGSDHYAT————— 538
 CD45 : GMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPE 598
 *** *

LAR : —————
 CD45 : KLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQQS 639

第 10 図

10/10



1/30

SEQUENCE LISTING

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Antibody Specific for Cytoplasmic Domain of
Protein Tyrosine Phosphatase

<130> 98P067

<160> 8

<210> 1

<211> 3467

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (6)..(1826)

<220>

<221> misc_feature

<222> (213)..(953)

<223> Tyrosine Phosphatase Domain 1

<220>

2/30

<221> misc_feature

<222> (1080)..(1826)

<223> Tyrosine Phosphatase Domain 2

<300>

<308> DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. Y00815

<309> 1995-09-19

<400> 1

gatcc gga ctg aag gac tcc ttg ctg gcc cac tcc tct gac cct gtg gag 50

Gly Leu Lys Asp Ser Leu Leu Ala His Ser Ser Asp Pro Val Glu

1 5 10 15

atg cgg agg ctc aac tac cag acc cca ggt atg cga gac cac cca ccc 98

Met Arg Arg Leu Asn Tyr Gln Thr Pro Gly Met Arg Asp His Pro Pro

20 25 30

atc ccc atc acc gac ctg gcg gac aac atc gag cgc ctc aaa gcc aac 146

Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn

35 40 45

gat ggc ctc aag ttc tcc cag gag tat gag tcc atc gac cct gga cag 194

Asp Gly Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly Gln

50 55 60

cag ttc acg tgg gag aat tca aac ctg gag gtg aac aag ccc aag aac 242

Gln Phe Thr Trp Glu Asn Ser Asn Leu Glu Val Asn Lys Pro Lys Asn

65 70 75

cgc tat ggc aat gtc atc gcc tac gac cac tct cga gtc atc ctt acc	290
Arg Tyr Ala Asn Val Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Ile Leu Thr	
80 85 90 95	
tct atc gat ggc gtc ccc ggg agt gac tac atc aat gcc aac tac atc	338
Ser Ile Asp Gly Val Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile	
100 105 110	
gat ggc tac cgc aag cag aat gcc tac atc gcc acg cag ggc ccc ctg	386
Asp Gly Tyr Arg Lys Gln Asn Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu	
115 120 125	
ccc gag acc atg ggc gat ttc tgg aga atg gtg tgg gaa cag cgc acg	434
Pro Glu Thr Met Gly Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Arg Thr	
130 135 140	
gcc act gtg gtc atg atg aca cgg ctg gag gag aag tcc cgg gta aaa	482
Ala Thr Val Val Met Met Thr Arg Leu Glu Glu Lys Ser Arg Val Lys	
145 150 155	
tgt gat cag tac tgg cca gcc cgt ggc acc gag acc tgt ggc ctt att	530
Cys Asp Gln Tyr Trp Pro Ala Arg Gly Thr Glu Thr Cys Gly Leu Ile	
160 165 170 175	
cag gtg acc ctg ttg gac aca gtg gag ctg gcc aca tac act gtg cgc	578
Gln Val Thr Leu Leu Asp Thr Val Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Val Arg	
180 185 190	
acc ttc gca ctc cac aag agt ggc tcc agt gag aag cgt gag ctg cgt	626
Thr Phe Ala Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Glu Lys Arg Glu Leu Arg	
195 200 205	

4/30

cag ttt cag ttc atg gcc tgg cca gac cat gga gtt cct gag tac cca	674
Gln Phe Gln Phe Met Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro	
210 215 220	
act ccc atc ctg gcc ttc cta cga cgg gtc aag gcc tgc aac ccc cta	722
Thr Pro Ile Leu Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Ala Cys Asn Pro Leu	
225 230 235	
gac gca ggg ccc atg gtg gtg cac tgc agc gcg ggc gtg ggc cgc acc	770
Asp Ala Gly Pro Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr	
240 245 250 255	
ggc tgc ttc atc gtg att gat gcc atg ttg gag cgg atg aag cac gag	818
Gly Cys Phe Ile Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Met Lys His Glu	
260 265 270	
aag acg gtg gac atc tat ggc cac gtg acc tgc atg cga tca cag agg	866
Lys Thr Val Asp Ile Tyr Gly His Val Thr Cys Met Arg Ser Gln Arg	
275 280 285	
aac tac atg gtg cag acg gag gac cag tac gtg ttc atc cat gag gcg	914
Asn Tyr Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Ile His Glu Ala	
290 295 300	
ctg ctg gag gct gcc acg tgc ggc cac aca gag gtg cct gcc cgc aac	962
Leu Leu Glu Ala Ala Thr Cys Gly His Thr Glu Val Pro Ala Arg Asn	
305 310 315	
ctg tat gcc cac atc cag aag ctg ggc caa gtg cct cca ggg gag agt	1010
Leu Tyr Ala His Ile Gln Lys Leu Gly Gln Val Pro Pro Gly Glu Ser	
320 325 330 335	

5/30

gtg acc gcc atg gag ctc gag ttc aag ttg ctg gcc agc tcc aag gcc 1058

Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Phe Lys Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ala

340.

345

350

cac acg tcc cgc ttc atc agc gcc aac ctg ccc tgc aac aag ttc aag 1106

His Thr Ser Arg Phe Ile Ser Ala Asn Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys

355

360

365

aac cgg ctg gtg aac atc atg ccc tac gaa ttg acc cgt gtg tgt ctg 1154

Asn Arg Leu Val Asn Ile Met Pro Tyr Glu Leu Thr Arg Val Cys Leu

370

375

380

cag ccc atc cgt ggt gtg gag ggc tct gac tac atc aat gcc agc ttc 1202

Gln Pro Ile Arg Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe

385

390

395

ctg gat ggt tat aga cag cag aag gcc tac ata gct aca cag ggg cct 1250

Leu Asp Gly Tyr Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro

400

405

410

415

ctg gca gag agc acc gag gac ttc tgg cgc atg cta tgg gag cac aat 1298

Leu Ala Glu Ser Thr Glu Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn

420

425

430

tcc acc atc atc gtc atg ctg acc aag ctt cgg gag atg ggc agg gag 1346

Ser Thr Ile Ile Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu

435

440

445

aaa tgc cac cag tac tgg cca gca gag cgc tct gct cgc tac cag tac 1394

Lys Cys His Gln Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr

450

455

460

6/30

ttt gtt gtt gac ccg atg gct gag tac aac atg ccc cag tat atc ctg	1442		
Phe Val Val Asp Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu			
465	470		
cgt gag ttc aag gtc acg gat gcc cgg gat ggg cag tca agg aca atc	1490		
Arg Glu Phe Lys Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Ile			
480	485	490	495
cgg cag ttc cag ttc aca gac tgg cca gag cag ggc gtg ccc aag aca	1538		
Arg Gln Phe Gln Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Thr			
500	505	510	
ggc gag gga ttc att gac ttc atc ggg cag gtg cat aag acc aag gag	1586		
Gly Glu Gly Phe Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu			
515	520	525	
cag ttc gga cag gat ggg cct atc acg gtg cac tgc agt gct ggc gtg	1634		
Gln Phe Gly Gln Asp Gly Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Val			
530	535	540	
ggc cgc acc ggg gtg ttc atc act ctg agc atc gtc ctg gag cgc atg	1682		
Gly Arg Thr Gly Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met			
545	550	555	
cgc tat gag ggc gtg gtc gac atg ttt cag acc gtg aag acc ctg cgt	1730		
Arg Tyr Glu Gly Val Val Asp Met Phe Gln Thr Val Lys Thr Leu Arg			
560	565	570	575
aca cag cgt cct gcc atg gtg cag aca gag gac cag tat cag ctg tgc	1778		
Thr Gln Arg Pro Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Gln Leu Cys			
580	585	590	

tac cgt gcg gcc ctg gag tac ctc ggc agc ttt gac cac tat gca acg 1826

Tyr Arg Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr

595

600

605

taactaccgc tccccctctcc tccgccaccc ccgccgtggg gctccggagg ggaccagct 1886

cctctgagcc ataccgacca tcgtccagcc ctccctacgca gatgctgtca ctggcagagc 1946

acagcccacg gggatcacag cgtttcagga acgttgccac accaatcaga gaggcctagaa 2006

catccctggg caagtggatg gccagcagg caggcactgt ggcccttctg tccaccagac 2066

ccacctggag cccgcttcaa gtctctgtgt gcgtcccgcc attctctatg cttcttctca 2126

tgggggtgggg ttggggcaaa gcctcctttt taatacatta agtggggtag actgagggat 2186

tttagcctct tccctctgat ttttccttc gcgaatccgt atctgcagaa tgggccactg 2246

taggggttgg ggcttatttt gttttgtttt tttttttttt ttgtatgact tctgctgaag 2306

gacagaacat tgccttcctc gtgcagagct ggggctgccg gcctgagcgg aggcctggcc 2366

gtgggccggg aggcagtgtt gatccggctg ctccctccagc ccttcagacg agatcctgtt 2426

tcagctaaat gcagggaaaac tcaatgtttt ttaagtgttt gtttccctt taaagccttt 2486

ttttaggcca cattgacagt ggtgggcggg gagaagatag ggaacactca tccctggctg 2546

tctatcccag tgttgtttta acattcacag cccagaacca cagatgtgtc tgggagagcc 2606

tggcaaggca ttctcatca ccatcgtgtt tgcaaagggt aaaacaaaaa caaaaaacca 2666

caaaaaataaa aaacaaaaaa aacaaaaaac ccaaaaaaaa aaaaaaaaag agtcagccct 2726

tggcttctgc ttcaaaccct caagagggga agcaactccg tgtgcctggg gttcccagg 2786

gagctgctgg ctgacctggg cccacagagc ctggctttgg tcccagcat tgcagtatgg 2846

tgtggtgttt gtaggctgtg gggctctggc gtgtggccaa ggtgaatagc acaggtagg 2906

gtgtgtgcc aaccccatgc acctcagggc caagcggggg cgtggctggc ctttcaggtc 2966

caggccagtg ggccctggtag cacatgtctg tccctcagagc aggggccaga tgattttcct 3026

ccctgggttg cagctgtttt caaagccccc gataategct cttttccact ccaagatgcc 3086

ctcataaacc aatgtggcaa gactactgga cttctatcaa tggtaactta atcagtcctt 3146

attatcccag cttgtctagg ggcagggaga gcgcctcttc ctctgggcag cgctatctag 3206

ataggtaagt gggggcgggg aagggtgcat agctgtttta gctgaggac gtggtgccga 3266
 cgtcccaaaa cctagctagg ctaagtcaag atcaacattc cagggttggt aatgttgat 3326
 gatgaaacat tcatttttac cttgtggatg ctagtgctgt agagttcact gttgtacaca 3386
 gtctgttttc tatttgtaa gaaaaactac agcatcattg cataatlcct gatggtaata 3446
 aatttgaata atcagatttc t 3467

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Signature Motif Conserved in Phosphatase Domain of Known
 PTPs.

<220>

<221> UNSURE

<222> (1)

<223> "Xaa"="Ile" or "Val".

<220>

<221> UNSURE

<222> (10)

<223> "Xaa"="Ser" or "Thr".

<400> 2

9/30

Xaa His Cys Xaa Ala Gly Xaa Xaa Arg Xaa Gly

1

5

10

<210> 3

<211> 7702

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (371).. (6064)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (371).. (418)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (419).. (6061)

<220>

<221> misc_feature

<222> (419).. (4120)

<223> Extracellular Domain

<220>

10/30

<221> misc_feature

<222> (4121).. (4192)

<223> Transmembrane Domain

<220>

<221> misc_feature

<222> (4193).. (6061)

<223> Cytoplasmic Domain

<300>

<308> DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. Y00815

<309> 19-SEP-1995

<400> 3

cgggagcggc gggagcggtg gcggcggcag aggcggcggc tccagcttcg gctccggctc 60
 gggctcgggc tccggtccg gctccggctc cggtccagc tcgggtggcg gtggcgggag 120
 cgggaccagg tggaggcggc gcggcagag gagtgggagc agcggcccta gcggcctgcg 180
 gggggacatg cggaccgacg gcccctggat aggcggaagg agtggaggcc ctggtgcccc 240
 gcccttggtg ctgagtatcc agcaagagtg accgggggtga agaagcaaag actcggttga 300
 ttgtcctggg ctgtggctgg ctgtggagct agagccctgg atggccctg agccagcccc 360
 agggaggacg atg gtg ccc ctt gtg cct gca ctg gtg atg ctt ggt ttg 409

Met Val Pro Leu Val Pro Ala Leu Val Met Leu Gly Leu

-15

-10

-5

gtg gca ggc gcc cat ggt gac agc aaa cct gtc ttc att aaa gtc cct 457

Val Ala Gly Ala His Gly Asp Ser Lys Pro Val Phe Ile Lys Val Pro

1

5

10

11/30

gag gac cag act ggg ctg tca gga ggg gta gcc tcc ttc gtg tgc caa	505
Glu Asp Gln Thr Gly Leu Ser Gly Gly Val Ala Ser Phe Val Cys Gln	
15 20 25	
gct aca gga gaa ccc aag ccg cgc atc aca tgg atg aag aag ggg aag	553
Ala Thr Gly Glu Pro Lys Pro Arg Ile Thr Trp Met Lys Lys Gly Lys	
30 35 40 45	
aaa gtc agc tcc cag cgc ttc gag gtc att gag ttt gat gat ggg gca	601
Lys Val Ser Ser Gln Arg Phe Glu Val Ile Glu Phe Asp Asp Gly Ala	
50 55 60	
ggg tca gtg ctt cgg atc cag cca ttg cgg gtg cag cga gat gaa gcc	649
Gly Ser Val Leu Arg Ile Gln Pro Leu Arg Val Gln Arg Asp Glu Ala	
65 70 75	
atc tat gag tgt aca gct act aac agc ctg ggt gag atc aac act agt	697
Ile Tyr Glu Cys Thr Ala Thr Asn Ser Leu Gly Glu Ile Asn Thr Ser	
80 85 90	
gcc aag ctc tca gtg ctc gaa gag gaa cag ctg ccc cct ggg ttc cct	745
Ala Lys Leu Ser Val Leu Glu Glu Glu Gln Leu Pro Pro Gly Phe Pro	
95 100 105	
tcc atc gac atg ggg cct cag ctg aag gtg gtg gag aag gca cgc aca	793
Ser Ile Asp Met Gly Pro Gln Leu Lys Val Val Glu Lys Ala Arg Thr	
110 115 120 125	
gcc acc atg cta tgt gcc gca ggc gga aat cca gac cct gag att tet	841
Ala Thr Met Leu Cys Ala Ala Gly Gly Asn Pro Asp Pro Glu Ile Ser	
130 135 140	

12/30

tgg ttc aag gac ttc ctt cct gta gac cct gcc acg agc aac ggc cgc	889
Trp Phe Lys Asp Phe Leu Pro Val Asp Pro Ala Thr Ser Asn Gly Arg	
145 150 155	
atc aag cag ctg cgt tca ggt gcc ttg cag ata gag agc agt gag gaa	937
Ile Lys Gln Leu Arg Ser Gly Ala Leu Gln Ile Glu Ser Ser Glu Glu	
160 165 170	
tcc gac caa ggc aag tac gag tgt gtg gcg acc aac tcg gca ggc aca	985
Ser Asp Gln Gly Lys Tyr Glu Cys Val Ala Thr Asn Ser Ala Gly Thr	
175 180 185	
cgt tac tca gcc cct gcg aac ctg tat gtg cga gtg cgc cgc gtg gct	1033
Arg Tyr Ser Ala Pro Ala Asn Leu Tyr Val Arg Val Arg Arg Val Ala	
190 195 200 205	
cct cgt ttc tcc atc cct ccc agc agc cag gag gtg atg cca ggc ggc	1081
Pro Arg Phe Ser Ile Pro Pro Ser Ser Gln Glu Val Met Pro Gly Gly	
210 215 220	
agc gtg aac ctg aca tgc gtg gca gtg ggt gca ccc atg ccc tac gtg	1129
Ser Val Asn Leu Thr Cys Val Ala Val Gly Ala Pro Met Pro Tyr Val	
225 230 235	
aag tgg atg atg ggg gcc gag gag ctc acc aag gag gat gag atg cca	1177
Lys Trp Met Met Gly Ala Glu Glu Leu Thr Lys Glu Asp Glu Met Pro	
240 245 250	
gtt ggc cgc aac gtc ctg gag ctc agc aat gtc gta cgc tct gcc aac	1225
Val Gly Arg Asn Val Leu Glu Leu Ser Asn Val Val Arg Ser Ala Asn	
255 260 265	

tac acc tgt gtg gcc atc tcc tcg ctg ggc atg atc gag gcc aca gcc 1273
Tyr Thr Cys Val Ala Ile Ser Ser Leu Gly Met Ile Glu Ala Thr Ala
270 275 280 285
cag gtc aca gtg aaa gct ctt cca aag cct ccg att gat ctt gtg gtg 1321
Gln Val Thr Val Lys Ala Leu Pro Lys Pro Pro Ile Asp Leu Val Val
290 295 300
aca gag aca act gcc acc agt gtc acc ctc acc tgg gac tct ggg aac 1369
Thr Glu Thr Thr Ala Thr Ser Val Thr Leu Thr Trp Asp Ser Gly Asn
305 310 315
tcg gag cct gta acc tac tat ggc atc cag tac cgc gca gcg ggc acg 1417
Ser Glu Pro Val Thr Tyr Tyr Gly Ile Gln Tyr Arg Ala Ala Gly Thr
320 325 330
gag ggc ccc ttt cag gag gtg gat ggt gtg gcc acc acc cgc tac agc 1465
Glu Gly Pro Phe Gln Glu Val Asp Gly Val Ala Thr Thr Arg Tyr Ser
335 340 345
att ggc ggc ctc agc cct ttc tcg gaa tat gcc ttc cgc gtg ctg gcg 1513
Ile Gly Gly Leu Ser Pro Phe Ser Glu Tyr Ala Phe Arg Val Leu Ala
350 355 360 365
gtg aac agc atc ggg cga ggg ccg ccc agc gag gca gtg cgg gca cgc 1561
Val Asn Ser Ile Gly Arg Gly Pro Pro Ser Glu Ala Val Arg Ala Arg
370 375 380
acg gga gaa cag gcg ccc tcc agc cca ccg cgc cgc gtg cag gca cgc 1609
Thr Gly Glu Gln Ala Pro Ser Ser Pro Pro Arg Arg Val Gln Ala Arg
385 390 395

14/30

atg ctg agc gcc agc acc atg ctg gtg cag tgg gag cct ccc gag gag	1657
Met Leu Ser Ala Ser Thr Met Leu Val Gln Trp Glu Pro Pro Glu Glu	
400 405 410	
ccc aac ggc ctg gtg cgg gga tac cgc gtc tac tat act ccg gac tcc	1705
Pro Asn Gly Leu Val Arg Gly Tyr Arg Val Tyr Tyr Thr Pro Asp Ser	
415 420 425	
cgc cgc ccc ccg aac gcc tgg cac aag cac aac acc gac gcg ggg ctc	1753
Arg Arg Pro Pro Asn Ala Trp His Lys His Asn Thr Asp Ala Gly Leu	
430 435 440 445	
ctc acg acc gtg ggc agc ctg ctg cct ggc atc acc tac agc ctg cgc	1801
Leu Thr Thr Val Gly Ser Leu Leu Pro Gly Ile Thr Tyr Ser Leu Arg	
450 455 460	
gtg ctt gcc ttc acc gcc gtg ggc gat ggc cct ccc agc ccc acc atc	1849
Val Leu Ala Phe Thr Ala Val Gly Asp Gly Pro Pro Ser Pro Thr Ile	
465 470 475	
cag gtc aag acg cag cag gga gtg cct gcc cag ccc gcg gac ttc cag	1897
Gln Val Lys Thr Gln Gln Gly Val Pro Ala Gln Pro Ala Asp Phe Gln	
480 485 490	
gcc gag gtg gag tcg gac acc agg atc cag ctc tcg tgg ctg ctg ccc	1945
Ala Glu Val Glu Ser Asp Thr Arg Ile Gln Leu Ser Trp Leu Leu Pro	
495 500 505	
cct cag gag cgg atc atc atg tat gaa ctg gtg tac tgg gcg gca gag	1993
Pro Gln Glu Arg Ile Ile Met Tyr Glu Leu Val Tyr Trp Ala Ala Glu	
510 515 520 525	

15/30

gac gaa gac caa cag cac aag gtc acc ttc gac cca acc tcc tcc tac 2041

Asp Glu Asp Gln Gln His Lys Val Thr Phe Asp Pro Thr Ser Ser Tyr

530

535

540

aca cta gag gac ctg aag cct gac aca ctc tac cgc ttc cag ctg gct 2089

Thr Leu Glu Asp Leu Lys Pro Asp Thr Leu Tyr Arg Phe Gln Leu Ala

545

550

555

gca cgc tcg gat atg ggg gtg ggc gtc ttc acc ccc acc att gag gcc 2137

Ala Arg Ser Asp Met Gly Val Gly Val Phe Thr Pro Thr Ile Glu Ala

560

565

570

cgc aca gcc cag tcc acc ccc tcc gcc cct ccc cag aag gtg atg tgt 2185

Arg Thr Ala Gln Ser Thr Pro Ser Ala Pro Pro Gln Lys Val Met Cys

575

580

585

gtg agc atg ggc tcc acc acg gtc cgg gta agt tgg gtc ccg ccg cct 2233

Val Ser Met Gly Ser Thr Thr Val Arg Val Ser Trp Val Pro Pro Pro

590

595

600

605

gcc gac agc cgc aac ggc gtt atc acc cag tac tcc gtg gcc cac gag 2281

Ala Asp Ser Arg Asn Gly Val Ile Thr Gln Tyr Ser Val Ala His Glu

610

615

620

gcg gtg gac ggc gag gac cgc ggg cgg cat gtg gtg gat ggc atc agc 2329

Ala Val Asp Gly Glu Asp Arg Gly Arg His Val Val Asp Gly Ile Ser

625

630

635

cgt gag cac tcc agc tgg gac ctg gtg ggc ctg gag aag tgg acg gag 2377

Arg Glu His Ser Ser Trp Asp Leu Val Gly Leu Glu Lys Trp Thr Glu

640

645

650

tac cgg gtg tgg gtg cgg gca cac aca gac gtg ggc ccc ggc ccc gag 2425
 Tyr Arg Val Trp Val Arg Ala His Thr Asp Val Gly Pro Gly Pro Glu

655

660

665

agc agc ccg gtg ctg gtg cgc acc gat gag gac gtg ccc agc ggg cct 2473
 Ser Ser Pro Val Leu Val Arg Thr Asp Glu Asp Val Pro Ser Gly Pro

670

675

680

685

ccg cgg aag gtg gag gtg gag cca ctg aac tcc act gct gtg cat gtc 2521
 Pro Arg Lys Val Glu Val Glu Pro Leu Asn Ser Thr Ala Val His Val

690

695

700

tac tgg aag ctg cct gtc ccc agc aag cag cat ggc cag atc cgc ggc 2569
 Tyr Trp Lys Leu Pro Val Pro Ser Lys Gln His Gly Gln Ile Arg Gly

705

710

715

tac cag gtc acc tac gtg cgg ctg gag aat ggc gag ccc cgt gga ctc 2617
 Tyr Gln Val Thr Tyr Val Arg Leu Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Leu

720

725

730

ccc atc atc caa gac gtc atg cta gcc gag gcc cag tgg cgg cca gag 2665
 Pro Ile Ile Gln Asp Val Met Leu Ala Glu Ala Gln Trp Arg Pro Glu

735

740

745

gag tcc gag gac tat gaa acc act atc agc ggc ctg acc ccg gag acc 2713
 Glu Ser Glu Asp Tyr Glu Thr Thr Ile Ser Gly Leu Thr Pro Glu Thr

750

755

760

765

acc tac tcc gtt act gtt gct gcc tat acc acc aag ggg gat ggt gcc 2761
 Thr Tyr Ser Val Thr Val Ala Ala Tyr Thr Thr Lys Gly Asp Gly Ala

770

775

780

cgc agc aag ccc aaa att gtc act aca aca ggt gca gtc cca ggc cgg 2809

Arg Ser Lys Pro Lys Ile Val Thr Thr Thr Gly Ala Val Pro Gly Arg

785

790

795

ccc acc atg atg atc agc acc acg gcc atg aac act gcg ctg ctc cag 2857

Pro Thr Met Met Ile Ser Thr Thr Ala Met Asn Thr Ala Leu Leu Gln

800

805

810

tgg cac cca ccc aag gaa ctg cct ggc gag ctg ctg ggc tac cgg ctg 2905

Trp His Pro Pro Lys Glu Leu Pro Gly Glu Leu Leu Gly Tyr Arg Leu

815

820

825

cag tac tgc cgg gcc gac gag gcg cgg ccc aac acc ata gat ttc ggc 2953

Gln Tyr Cys Arg Ala Asp Glu Ala Arg Pro Asn Thr Ile Asp Phe Gly

830

835

840

845

aag gat gac cag cac ttc aca gtc acc ggc ctg cac aag ggg acc acc 3001

Lys Asp Asp Gln His Phe Thr Val Thr Gly Leu His Lys Gly Thr Thr

850

855

860

tac atc ttc cgg ctt gct gcc aag aac cgg gct ggc ttg ggt gag gag 3049

Tyr Ile Phe Arg Leu Ala Ala Lys Asn Arg Ala Gly Leu Gly Glu Glu

865

870

875

ttc gag aag gag atc agg acc ccc gag gac ctg ccc agc ggc ttc ccc 3097

Phe Glu Lys Glu Ile Arg Thr Pro Glu Asp Leu Pro Ser Gly Phe Pro

880

885

890

caa aac ctg cat gtg aca gga ctg acc acg tct acc aca gaa ctg gcc 3145

Gln Asn Leu His Val Thr Gly Leu Thr Thr Ser Thr Thr Glu Leu Ala

895

900

905

tgg gac ccg cca gtg ctg gcg gag agg aac ggg cgc atc atc agc tac 3193
 Trp Asp Pro Pro Val Leu Ala Glu Arg Asn Gly Arg Ile Ile Ser Tyr
 910 915 920 925
 acc gtg gtg ttc cga gac atc aac agc caa cag gag ctg cag aac atc 3241
 Thr Val Val Phe Arg Asp Ile Asn Ser Gln Gln Glu Leu Gln Asn Ile
 930 935 940
 acg aca gac acc cgc ttt acc ctt act ggc ctc aag cca gac acc act 3289
 Thr Thr Asp Thr Arg Phe Thr Leu Thr Gly Leu Lys Pro Asp Thr Thr
 945 950 955
 tac gac atc aag gtc cgc gca tgg acc agc aaa ggc tct ggc cca ctc 3337
 Tyr Asp Ile Lys Val Arg Ala Trp Thr Ser Lys Gly Ser Gly Pro Leu
 960 965 970
 agc ccc agc atc cag tcc cgg acc atg ccg gtg gag caa gtg ttt gcc 3385
 Ser Pro Ser Ile Gln Ser Arg Thr Met Pro Val Glu Gln Val Phe Ala
 975 980 985
 aag aac ttc cgg gtg gcg gct gca atg aag acg tct gtg ctg ctc agc 3433
 Lys Asn Phe Arg Val Ala Ala Ala Met Lys Thr Ser Val Leu Leu Ser
 990 995 1000 1005
 tgg gag gtt ccc gac tcc tat aag tca gct gtg ccc ttt aag att ctg 3481
 Trp Glu Val Pro Asp Ser Tyr Lys Ser Ala Val Pro Phe Lys Ile Leu
 1010 1015 1020
 tac aat ggg cag agt gtg gag gtg gac ggg cac tcg atg cgg aag ctg 3529
 Tyr Asn Gly Gln Ser Val Glu Val Asp Gly His Ser Met Arg Lys Leu
 1025 1030 1035

atc gca gac ctg cag ccc aac aca gag tac tgc ttt gtg ctg atg aac 3577
 Ile Ala Asp Leu Gln Pro Asn Thr Glu Tyr Ser Phe Val Leu Met Asn
 1040 1045 1050
 cgt ggc agc agc gca ggg ggc ctg cag cac ctg gtg tcc atc cgc aca 3625
 Arg Gly Ser Ser Ala Gly Gly Leu Gln His Leu Val Ser Ile Arg Thr
 1055 1060 1065
 gcc ccc gac ctc ctg cct cac aag ccg ctg cct gcc tct gcc tac ata 3673
 Ala Pro Asp Leu Leu Pro His Lys Pro Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile
 1070 1075 1080 1085
 gag gac ggc cgc ttc gat ctc tcc atg ccc cat gtg caa gac ccc tgc 3721
 Glu Asp Gly Arg Phe Asp Leu Ser Met Pro His Val Gln Asp Pro Ser
 1090 1095 1100
 ctt gtc agg tgg ttc tac att gtt gtg gta ccc att gac cgt gtg ggc 3769
 Leu Val Arg Trp Phe Tyr Ile Val Val Val Pro Ile Asp Arg Val Gly
 1105 1110 1115
 ggg agc atg ctg acg cca agg tgg agc aca ccc gag gaa ctg gag ctg 3817
 Gly Ser Met Leu Thr Pro Arg Trp Ser Thr Pro Glu Glu Leu Glu Leu
 1120 1125 1130
 gac gag ctt cta gaa gcc atc gag caa ggc gga gag gag cag cgg cgg 3865
 Asp Glu Leu Leu Glu Ala Ile Glu Gln Gly Gly Glu Glu Gln Arg Arg
 1135 1140 1145
 cgg cgg cgg cag gca gaa cgt ctg aag cca tat gtg gct gct caa ctg 3913
 Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Leu Lys Pro Tyr Val Ala Ala Gln Leu
 1150 1155 1160 1165

20/30

gat gtg ctc ccg gag acc ttt acc ttg ggg gac aag aag aac tac cgg	3961
Asp Val Leu Pro Glu Thr Phe Thr Leu Gly Asp Lys Lys Asn Tyr Arg	
1170	1175
ggc ttc tac aac cgg ccc ctg tct ccg gac ttg agc tac cag tgc ttt	4009
Gly Phe Tyr Asn Arg Pro Leu Ser Pro Asp Leu Ser Tyr Gln Cys Phe	
1185	1190
gtg ctt gcc tcc ttg aag gaa ccc atg gac cag aag cgc tat gcc tcc	4057
Val Leu Ala Ser Leu Lys Glu Pro Met Asp Gln Lys Arg Tyr Ala Ser	
1200	1205
agc ccc tac tcg gat gag atc gtg gtc cag gtg aca cca gcc cag cag	4105
Ser Pro Tyr Ser Asp Glu Ile Val Val Gln Val Thr Pro Ala Gln Gln	
1215	1220
cag gag gag ccg gag atg ctg tgg gtg acg ggt ccc gtg ctg gca gtc	4153
Gln Glu Glu Pro Glu Met Leu Trp Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Val	
1230	1235
atc ctc atc atc ctc att gtc atc gcc atc ctc ttg ttc aaa agg aaa	4201
Ile Leu Ile Ile Leu Ile Val Ile Ala Ile Leu Leu Phe Lys Arg Lys	
1250	1255
agg acc cac tct ccg tcc tct aag gat gag cag tcg atc gga ctg aag	4249
Arg Thr His Ser Pro Ser Ser Lys Asp Glu Gln Ser Ile Gly Leu Lys	
1265	1270
gac tcc ttg ctg gcc cac tcc tct gac cct gtg gag atg cgg agg ctc	4297
Asp Ser Leu Leu Ala His Ser Ser Asp Pro Val Glu Met Arg Arg Leu	
1280	1285
	1290

21/30

aac tac cag acc cca ggt atg cga gac cac cca ccc atc ccc atc acc 4345
 Asn Tyr Gln Thr Pro Gly Met Arg Asp His Pro Pro Ile Pro Ile Thr
 1295 1300 1305
 gac ctg gcg gac aac atc gag cgc ctc aaa gcc aac gat ggc ctc aag 4393
 Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Gly Leu Lys
 1310 1315 1320 1325
 ttc tcc cag gag tat gag tcc atc gac cct gga cag cag ttc acg tgg 4441
 Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly Gln Gln Phe Thr Trp
 1330 1335 1340
 gag aat tca aac ctg gag gtg aac aag ccc aag aac cgc tat gcg aat 4489
 Glu Asn Ser Asn Leu Glu Val Asn Lys Pro Lys Asn Arg Tyr Ala Asn
 1345 1350 1355
 gtc atc gcc tac gac cac tct cga gtc atc ctt acc tct atc gat ggc 4537
 Val Ile Ala Tyr Asp His Ser Arg Val Ile Leu Thr Ser Ile Asp Gly
 1360 1365 1370
 gtc ccc ggg agt gac tac atc aat gcc aac tac atc gat ggc tac cgc 4585
 Val Pro Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Asp Gly Tyr Arg
 1375 1380 1385
 aag cag aat gcc tac atc gcc acg cag ggc ccc ctg ccc gag acc atg 4633
 Lys Gln Asn Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Glu Thr Met
 1390 1395 1400 1405
 ggc gat ttc tgg aga atg gtg tgg gaa cag cgc acg gcc act gtg gtc 4681
 Gly Asp Phe Trp Arg Met Val Trp Glu Gln Arg Thr Ala Thr Val Val
 1410 1415 1420

22/30

atg atg aca cgg ctg gag gag aag tcc cgg gta aaa tgt gat cag tac	4729
Met Met Thr Arg Leu Glu Glu Lys Ser Arg Val Lys Cys Asp Gln Tyr	
1425	1430
1435	
tgg cca gcc cgt ggc acc gag acc tgt ggc ctt att cag gtg acc ctg	4777
Trp Pro Ala Arg Gly Thr Glu Thr Cys Gly Leu Ile Gln Val Thr Leu	
1440	1445
1450	
ttg gac aca gtg gag ctg gcc aca tac act gtg cgc acc ttc gca ctc	4825
Leu Asp Thr Val Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Val Arg Thr Phe Ala Leu	
1455	1460
1465	
cac aag agt ggc tcc agt gag aag cgt gag ctg cgt cag ttt cag ttc	4873
His Lys Ser Gly Ser Ser Glu Lys Arg Glu Leu Arg Gln Phe Gln Phe	
1470	1475
1480	1485
atg gcc tgg cca gac cat gga gtt cct gag tac cca act ccc atc ctg	4921
Met Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Tyr Pro Thr Pro Ile Leu	
1490	1495
1500	
gcc ttc cta cga cgg gtc aag gcc tgc aac ccc cta gac gca ggg ccc	4969
Ala Phe Leu Arg Arg Val Lys Ala Cys Asn Pro Leu Asp Ala Gly Pro	
1505	1510
1515	
atg gtg gtg cac tgc agc gcg ggc gtg ggc cgc acc ggc tgc ttc atc	5017
Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Cys Phe Ile	
1520	1525
1530	
gtg att gat gcc atg ttg gag cgg atg aag cac gag aag acg gtg gac	5065
Val Ile Asp Ala Met Leu Glu Arg Met Lys His Glu Lys Thr Val Asp	
1535	1540
1545	

23/30

atc tat ggc cac gtg acc tgc atg cga tca cag agg aac tac atg gtg 5113
 Ile Tyr Gly His Val Thr Cys Met Arg Ser Gln Arg Asn Tyr Met Val
 1550 1555 1560 1565
 cag acg gag gac cag tac gtg ttc atc cat gag gcg ctg ctg gag gct 5161
 Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Val Phe Ile His Glu Ala Leu Leu Glu Ala
 1570 1575 1580
 gcc acg tgc ggc cac aca gag gtg cct gcc cgc aac ctg tat gcc cac 5209
 Ala Thr Cys Gly His Thr Glu Val Pro Ala Arg Asn Leu Tyr Ala His
 1585 1590 1595
 atc cag aag ctg ggc caa gtg cct cca ggg gag agt gtg acc gcc atg 5257
 Ile Gln Lys Leu Gly Gln Val Pro Pro Gly Glu Ser Val Thr Ala Met
 1600 1605 1610
 gag ctg gag ttc aag ttg ctg gcc agc tcc aag gcc cac acg tcc cgc 5305
 Glu Leu Glu Phe Lys Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ala His Thr Ser Arg
 1615 1620 1625
 ttc atc agc gcc aac ctg ccc tgc aac aag ttc aag aac cgg ctg gtg 5353
 Phe Ile Ser Ala Asn Leu Pro Cys Asn Lys Phe Lys Asn Arg Leu Val
 1630 1635 1640 1645
 aac atc atg ccc tac gaa ttg acc cgt gtg tgt ctg cag ccc atc cgt 5401
 Asn Ile Met Pro Tyr Glu Leu Thr Arg Val Cys Leu Gln Pro Ile Arg
 1650 1655 1660
 ggt gtg gag ggc tct gac tac atc aat gcc agc ttc ctg gat ggt tat 5449
 Gly Val Glu Gly Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Leu Asp Gly Tyr
 1665 1670 1675

aga cag cag aag gcc tac ata gct aca cag ggg cct ctg gca gag agc	5497
Arg Gln Gln Lys Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Ala Glu Ser	
1680	1685
1690	
acc gag gac ttc tgg cgc atg cta tgg gag cac aat tcc acc atc atc	5545
Thr Glu Asp Phe Trp Arg Met Leu Trp Glu His Asn Ser Thr Ile Ile	
1695	1700
1705	
gtc atg ctg acc aag ctt cgg gag atg ggc agg gag aaa tgc cac cag	5593
Val Met Leu Thr Lys Leu Arg Glu Met Gly Arg Glu Lys Cys His Gln	
1710	1715
1720	1725
tac tgg cca gca gag cgc tct gct cgc tac cag tac ttt gtt gtt gac	5641
Tyr Trp Pro Ala Glu Arg Ser Ala Arg Tyr Gln Tyr Phe Val Val Asp	
1730	1735
1740	
ccg atg gct gag tac aac atg ccc cag tat atc ctg cgt gag ttc aag	5689
Pro Met Ala Glu Tyr Asn Met Pro Gln Tyr Ile Leu Arg Glu Phe Lys	
1745	1750
1755	
gtc acg gat gcc cgg gat ggg cag tca agg aca atc cgg cag ttc cag	5737
Val Thr Asp Ala Arg Asp Gly Gln Ser Arg Thr Ile Arg Gln Phe Gln	
1760	1765
1770	
ttc aca gac tgg cca gag cag ggc gtg ccc aag aca ggc gag gga ttc	5785
Phe Thr Asp Trp Pro Glu Gln Gly Val Pro Lys Thr Gly Glu Gly Phe	
1775	1780
1785	
att gac ttc atc ggg cag gtg cat aag acc aag gag cag ttt gga cag	5833
Ile Asp Phe Ile Gly Gln Val His Lys Thr Lys Glu Gln Phe Gly Gln	
1790	1795
1800	1805

25/30

gat ggg cct atc acg gtg cac tgc agt gct ggc gtg ggc cgc acc ggg 5881
 Asp Gly Pro Ile Thr Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly

1810

1815

1820

gtg ttc atc act ctg agc atc gtc ctg gag cgc atg cgc tat gag. ggc 5929
 Val Phe Ile Thr Leu Ser Ile Val Leu Glu Arg Met Arg Tyr Glu Gly

1825

1830

1835

gtg gtc gac atg ttt cag acc gtg aag acc ctg cgt aca cag cgt cct 5977
 Val Val Asp Met Phe Gln Thr Val Lys Thr Leu Arg Thr Gln Arg Pro

1840

1845

1850

gcc atg gtg cag aca gag gac cag tat cag ctg tgc tac cgt gcg gcc 6025
 Ala Met Val Gln Thr Glu Asp Gln Tyr Gln Leu Cys Tyr Arg Ala Ala

1855

1860

1865

ctg gag tac ctc ggc agc ttt gac cac tat gca acg taactaccgc 6071
 Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Phe Asp His Tyr Ala Thr 1881

1870

1875

1880

tccctctctc tccgccaccc ccgccgtggg gctccggagg ggaccagct cctctgagcc 6131
 ataccgacca tcgtccagcc ctctacgca gatgetgtca ctggcagagc acagcccacg 6191
 gggatcacag cgtttcagga acgttgccac accaatcaga gagcctagaa catccctggg 6251
 caagtggatg gccagcagg caggcactgt ggcccttctg tccaccagac ccacctggag 6311
 cccgcttcaa gctctctgtt gcgctccgc attctcatg cttcttctca tgggggtggg 6371
 ttggggcaaa gcctccttt taatacatta agtggggtag actgagggat ttagcctct 6431
 tccctctgat ttttctttc gcgaatcctg atctgcagaa tgggccactg taggggttg 6491
 ggtttatttt gttttgttt ttttttttt ttgtatgact tctgtgaag gacagaacat 6551
 tgccttcctc gtgcagagct ggggctgcc gcctgagcgg aggcctcgcc gtgggcccgg 6611
 aggcagtgt gatccggctg ctctccagc cttcagacg agatcctgtt tcagctaaat 6671
 gcagggaac tcaatgttt ttaagtgtt gttttccct taaagcctt ttttaggcca 6731

cattgacagt ggtgggceggg gagaagatag ggaacactca tccctggctg tctatcccag 6791
 tgtgtgttta acattcacag cccagaacca cagatgtgtc tgggagagcc tggcaaggca 6851
 ttctcatca ccatcgtgtt tgcaaagggtt aaaacaaaaa caaaaaacca caaaaataaa 6911
 aaacaaaaaa aacaaaaaac ccaaaaaaaa aaaaaaaaag agtcagccct tggcttctgc 6971
 ttcaaaccct caagagggga agcaactccg tgtgcctggg gtccccgagg gagctgctgg 7031
 ctgacctggg cccacagagc ctggctttgg tccccagcat tgcagtatgg tgtggtgttt 7091
 gtaggctgtg gggctctggc gtgtggccaa ggtgaatagc acaggttagg gtgtgtgcca 7151
 caccatgc acctcagggc caagcggggg cgtggctggc ctttcaggtc caggccagt 7211
 ggctggttag cacatgtctg tctcagagc aggggccaga tgatttccct ccttggtttg 7271
 cagctgtttt caaagcccc gataatcgt cttttccact ccaagatgcc ctcataaacc 7331
 aatgtggcaa gactactgga ctctatcaa tggactcta atcagtcctt attatcccag 7391
 cttgtcagg ggcagggaga gcgcctctt ctctgggcag cgctatctag ataggtaagt 7451
 gggggcggg aagggtgcat agctgtttta gctgaggac gtggtgccga cgtcccaaa 7511
 cctagctagg ctaagtcaag atcaacatt cagggttggt aatgttgat gatgaaacat 7571
 tcatttttac cttgtggatg ctagtgtgt agagttcact gttgtacaca gctgttttc 7631
 tatttgrta gaaaaactac agcatcattg cataattct gatggaata aatttgaata 7691
 atcagatttc t 7702

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Identical Sequence in Phosphatase Domain 1 of LAR and

CD

<400> 4

Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly

1

5

10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Consensus Amino Acid Sequence in Cytoplasmic Domain of
Known PTPs.

<220>

<221> UNSURE

<222> (3)

<223> "Xaa"="Arg", "Glu" or "Leu".

<220>

<221> UNSURE

<222> (5)

<223> "Xaa"="Val", "Ile" or "Cys".

<400> 5

Phe Trp Xaa Met Xaa Trp

1

5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Consensus Amino Acid Sequence in Cytoplasmic Domain of
Known PTPs.

<220>

<221> UNSURE

<222> (3)

<223> "Xaa"="Ala" or "Asp".

<220>

<221> UNSURE

<222> (4)

<223> "Xaa"="Gln", "Glu" or "Lys".

<400> 6

Lys Cys Xaa Xaa Tyr Trp Pro

1

5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Consensus Amino Acid Sequence in Cytoplasmic Domain of
Known PTPs.

<220>

<221> UNSURE

<222> (4)

<223> "Xaa"="His" or "Phe".

<400> 7

Trp Pro Asp Xaa Gly Val

1

5

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Consensus Amino Acid Sequence in Cytoplasmic Domain of
Known PTPs.

<220>

<221> UNSURE

<222> (3)

<223> "Xaa"="Ile" or "Val".

<220>

<221> UNSURE

<222> (4)

<223> "Xaa"="Ile" or "Val".

<220>

<221> UNSURE

<222> (13)

<223> "Xaa"="Thr" or "Ser".

<400> 8

Pro Xaa Xaa Xaa His Cys Xaa Ala Gly Xaa Gly Arg Xaa Gly

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K16/18, C12N5/20, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, C12N15/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K16/18, C12N5/20, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577, C12N15/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Wei-Ren ZHANG et al., "Molecular clonign and expression of a unique receptor-like protein-tyrosine-phosphatase in the leucocyte-common-antigen-related phosphatase family", Biochem. J. (1994), Vol. 302, No. 1 p.39-47	1-30
A	Michel Streuli et al., "A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen", J. Exp. Med. (1988), Vol. 168, No. 5 p.1553-1530	1-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 October, 1999 (18. 10. 99)Date of mailing of the international search report
26 October, 1999 (26. 10. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K 16/18, C12N 5/20, C12P 21/08, G01N 33/53,
G01N 33/577, C12N 15/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C07K 16/18, C12N 5/20, C12P 21/08, G01N 33/53,
G01N 33/577, C12N 15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Wei-Ren ZHANG et al. "Molecular cloning and expression of a unique receptor-like protein-tyrosine-phosphatase in the leucocyte-common-antigen-related phosphatase family", Biochem. J. (1994), Vol.302, No.1 p.39-47	1-30
A	Michel Streuli et al. "A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen", J. Exp. Med. (1988), Vol.168, No.5 p.1553-1530	1-30

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 10. 99

国際調査報告の発送日

26.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

